

THÈSE

présentée

devant l'Université Claude-Bernard de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur de Spécialité (3^e Cycle)
de Chimie (Biochimie)

par

Yvette DALMAZ

La dopamine dans le tissu chromaffine de la roussette : analyse quantitative et rôle dans la biosynthèse de la noradrénaline.

soutenue le 5 Juillet 1972

M^{lle} D. GAUTHERON Président

MM. J. F. CIER
G. PÉRÈS
M^{me} L. PEYRIN } Examineurs

Thème

Thématique

Année Universitaire 1980-1981

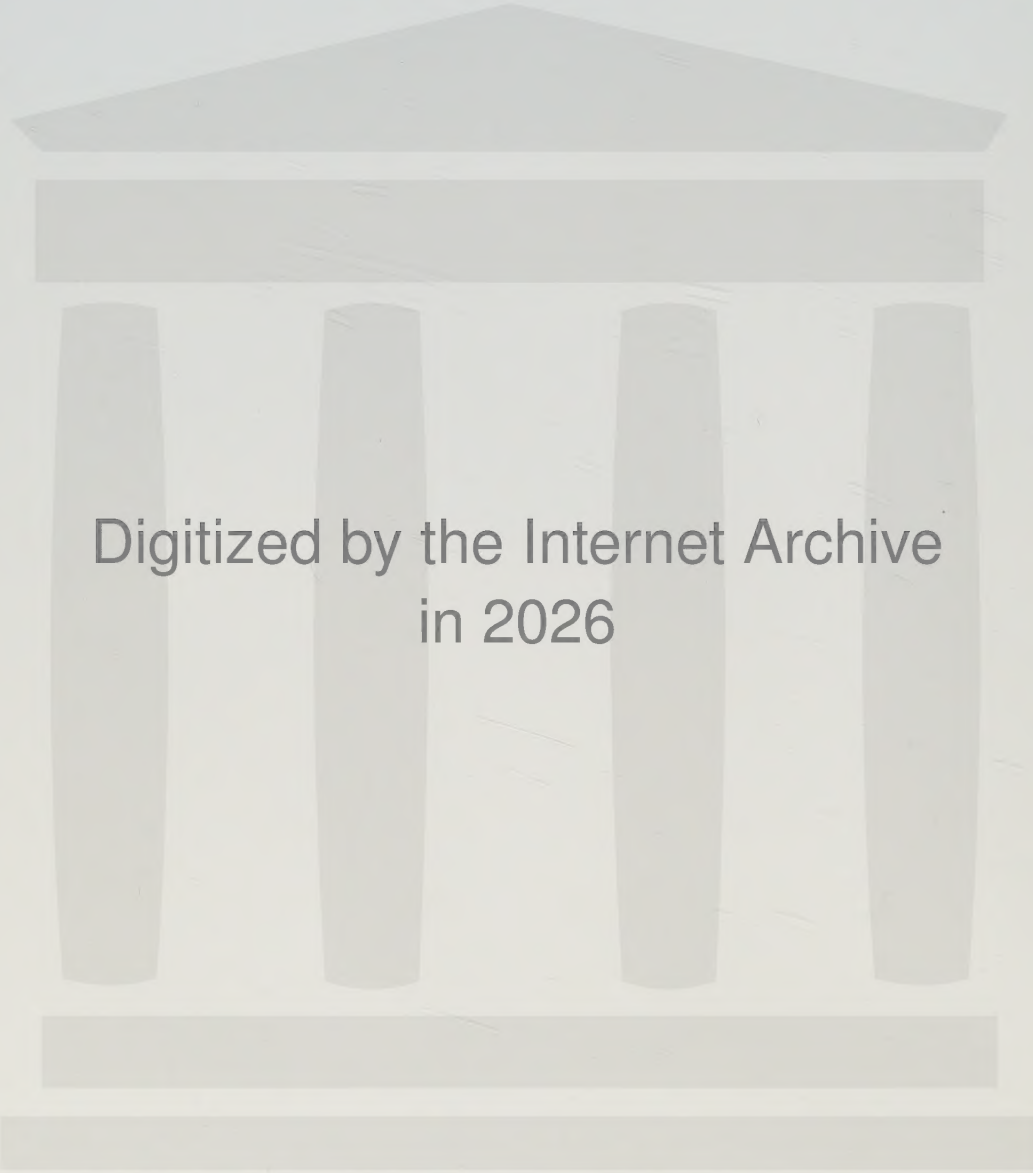
Année 1980

Le rôle de l'Union des étudiants en Pharmacie
de France (UEP)

par

Yvette DAUBET

La déposition des données thérapeutiques de la recherche :
une obligation de conscience et de responsabilité
des pharmaciens de la communauté.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552617_0056

THÈSE

présentée

devant l'Université Claude-Bernard de Lyon

pour obtenir

le diplôme de Docteur de Spécialité (3^e Cycle)

de Chimie (Biochimie)

par

Yvette DALMAZ

**La dopamine dans le tissu chromaffine de la roussette :
analyse quantitative et rôle dans la
biosynthèse de la noradrénaline.**

soutenue le 5 Juillet 1972

M^{lle} D. GAUTHERON Président

MM. J. F. CIER

G. PÉRÈS

M^{me} L. PEYRIN

} Examineurs

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD

L Y O N

Président : M. le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président: M. R. TOURAINE, Maître de Conférences Agrégé

2ème Vice Président: M. P. PONCET, Maître-Assistant

3ème Vice-Président: M. D. SETTELEN, Etudiant

UNITÉS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche

M. le Professeur D. GERMAIN

U.E.R. médicale Alexis Carrel

M. le Professeur C. GIROD

U.E.R. médicale LYON-Nord

M. le Professeur A. BERTOYE

U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest

M. le Professeur L. TOLOT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques

M. M. CARRAZ Maître de Conférences Ag

U.E.R. des Techniques de Réadaptation

M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN

U.E.R. de Biologie Humaine

M. J.C. CZYBA Maître de Conférences A

U.E.R. d'Education Physique et Sportive

M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques

M. R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques

M. le Doyen J. BRACONNIER

U.E.R. de Physique

M. le Professeur M. DUFAY

U.E.R. de Chimie et Biochimie

Mlle le Professeur D. GAUTHERON

U.E.R. des Sciences de la Nature

M. le Professeur L. DAVID

U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie

M. le Professeur R. FONTANGES

U.E.R. de Physique Nucléaire

M. le Professeur A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique

M. le Professeur J. MATHIEU

Observatoire

M. le Professeur J.H. BIGAY

Institut Universitaire de Technologie 1

M, le Professeur B. POUYET

Institut Universitaire de Technologie 2

M. J. GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Physiologie A de l'U.E.R. Grange-Blanche de l'Université Claude Bernard, sous la direction de Monsieur le Professeur J.F. CIER et le conseil scientifique de Madame L. PEYRIN, chargée de recherches au C.N.R.S.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Mademoiselle le Professeur D. GAUTHERON, Directeur de l'U.E.R. de Chimie de l'Université Claude BERNARD, pour la rigueur scientifique et la vivacité de l'enseignement dont elle m'a fait bénéficier en Biochimie. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir encouragée à mener ce travail de recherche à bien et d'avoir pu consacrer un temps précieux à me conseiller et à me lire. Je suis extrêmement sensible à l'honneur qu'elle me fait de présider le Jury de cette thèse.

Je remercie très vivement Monsieur le Doyen J.F. CIER, Directeur du Laboratoire de Physiologie de l'U.E.R. Grange Blanche, d'avoir bien voulu m'accepter dans son Laboratoire et de m'avoir donné les moyens d'entreprendre ce travail de recherche. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et à le remercier particulièrement de la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude et de son dynamisme, apprécié de ceux qui ont le privilège de travailler avec lui.

Je remercie Monsieur le Professeur G. PERES, Directeur du Laboratoire de Physiologie générale et comparée de l'U.E.R. de Biodynamique et de Psychophysiologie, d'avoir su, par son enseignement complet, m'intéresser à la Physiologie animale. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir permis d'obtenir, dans les meilleures conditions, les animaux marins indispensables pour mon expérimentation et de s'être intéressé à la réalisation de ce travail. Je le remercie vivement de l'honneur qu'il me fait de compter parmi les membres de mon Jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement Madame L. PEYRIN, Docteur es-Sciences, chargée de recherches au CNRS, à qui je dois ma formation pour la recherche. Elle a toujours suivi ce travail avec un intérêt constant et avec beaucoup d'attention et de patience. J'ai bénéficié de ses judicieux conseils dont la rigueur m'a permis de mener à bien cette recherche. Ses qualités humaines m'ont permis de travailler à ses côtés avec un égal plaisir et qu'il me soit permis, ici, de lui exprimer mon sincère attachement.

Mes remerciements vont également à tous les membres de l'équipe de recherche dont je fais partie et je tiens à remercier plus particulièrement Madame CELLIER pour la part active et le soin qu'elle a apportés dans la présentation de ce travail.

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

A	Adrénaline
NA	Noradrénaline
OHT	Dopamine
DOPA	3-4 dihydroxyphénylalanine
DHPS	Dihydroxyphénylsérine
ATP	Adénosine triphosphate
NADP NADPH	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate, forme oxydée et réduite
D β O	Dopamine β oxydase
K _m	Constante de Michaelis
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique, sel disodique
TCA	Acide trichloracétique
NEM	N ethylmaleimide
PNMT	Phényléthanolamine-N-méthyltransférase
MAO	Monoaminoxydase
COMT	Catéchol-O-méthyltransférase

PRINCIPAUX SYMBOLES

nmoles	nanomoles
φ	diamètre
μCi	microcurie
m	moyenne arithmétique
σ	écart type $\sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{N - 1}}$
s _m	écart sur la moyenne $= \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$
t	$= \frac{ m_1 - m_2 }{\sqrt{s_m^2 + s_m^2}} = \frac{d}{s_d}$

Les résultats expérimentaux sont exprimés sous la forme $m \pm s_m$. LA valeur de t permet de connaître le seuil de sécurité ρ pour évaluer avec quelle probabilité la différence entre deux moyennes est significative ou non (test t de Student)

INTRODUCTION

La glande médullosurrénale des Vertébrés supérieurs est le tissu privilégié de synthèse des catécholamines; ainsi, l'adrénaline, la noradrénaline et, à un degré moindre, la dopamine sont stockées dans des éléments cellulaires très spécialisés du tissu chromaffine.

La dopamine, substance intermédiaire dans la biosynthèse de l'adrénaline à partir de la tyrosine, est le précurseur immédiat de la noradrénaline dans le tissu chromaffine et les terminaisons nerveuses noradrénergiques des Vertébrés supérieurs. Cependant, la découverte de fortes concentrations en dopamine dans certains tissus de Mammifères (système nerveux central en particulier) a ouvert des perspectives nouvelles sur le rôle physiologique propre de cette catécholamine, s'ajoutant ainsi à son rôle de simple précurseur de la noradrénaline.

La dopamine est l'amine prédominante dans les tissus des Invertébrés, mais elle a été peu étudiée chez les Vertébrés inférieurs.

En particulier, à notre connaissance, la dopamine n'a jamais été étudiée dans le tissu chromaffine du Poisson Sélacien, *la Roussette*, ni en tant que précurseur de la noradrénaline présente, ni en tant que substance physiologiquement active. Le tissu chromaffine de ce Poisson contient de la Noradrénaline et de l'adrénaline et, malgré l'éloignement anatomique du corps interrénal (homologue du cortex surrénal des Vertébrés supérieurs) et des organes chromaffines, il peut méthyler la noradrénaline en adrénaline. Il présente donc des analogies biochimiques avec la glande médullosurrénale des Vertébrés supérieurs.

Nous nous sommes donc proposés d'étudier la dopamine dans les organes chromaffines de la Roussette en envisageant deux aspects :

- l'analyse qualitative et quantitative de la dopamine dans le tissu chromaffine,
- le rôle éventuel de la dopamine comme précurseur de la noradrénaline dans ce tissu.

Ce travail comprendra trois parties :

Dans une première partie nous rappellerons les voies possibles de biosynthèse de l'adrénaline et le rôle de la dopamine dans ces différents axes de biosynthèse pour l'ensemble du règne animal. La prépondérance de l'étape enzymatique, permettant d'hydroxyler la dopamine en noradrénaline, nous conduira à résumer les caractéristiques importantes de l'enzyme dopamine β oxydase.

Dans une deuxième partie nous exposerons les techniques d'étude classiques que nous avons utilisées.

Dans une troisième partie nous présenterons nos résultats expérimentaux puis nous les discuterons.

Cette partie comprendra :

- la mise au point d'une technique d'extraction et de dosage de la dopamine devant assurer pour cette amine une spécificité et une sensibilité maximales,
- la recherche de la dopamine dans les corps axillaires et les corps supra-rénaux de la Roussette par extraction du tissu chromaffine sur Amberlite CG 50 et dosage fluorimétrique des éluats,
- la mise en évidence de l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline dans les organes chromaffines de la Roussette par incubation in vitro du tissu chromaffine en présence de dopamine ^{14}C et de cofacteurs.

1ÈRE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

LES VOIES DE SYNTHÈSE DE L'ADRÉNALINE

I - SCHÉMA DE BLASCHKO -

En 1939, Blaschko et Holtz proposèrent la séquence de réactions suivantes (schéma 1) permettant de passer de la tyrosine à l'adrénaline par l'intermédiaire de quatre étapes enzymatiques.

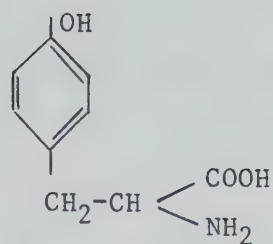
L'adrénaline est synthétisée par cette voie dans la glande médullosurrénale (Goodall et Kirshner, 1957; Bertler et al., 1960; Pellerin et d'Orio, 1957; Masuoka et al., 1956; Demis et al., 1955) et, à un degré moindre, dans le coeur et l'hypothalamus; par contre dans le cerveau (Mc Geer et al., 1963) et les fibres orthosympathiques postganglionnaires, la synthèse s'arrête au stade de la noradrénaline.

Le précurseur direct de la noradrénaline est la dopamine dans tout l'ensemble du système adrénergique.

II - LES VOIES ACCESSOIRES -

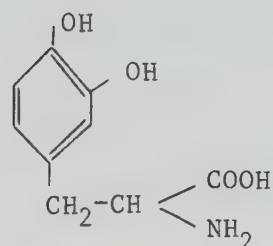
1/ DESCRIPTION -

Les enzymes (tyrosine hydroxylase, DOPA décarboxylase, dopamine β oxydase, phényléthanolamine N méthyl transférase = PNMT) inclus dans cette séquence de synthèse ont une faible spécificité de substrat (Lovemberg et al., 1962; Bridgers et Kaufman, 1962; Axelrod, 1962a, 1962b). Ainsi, la noradrénaline et l'adrénaline peuvent être synthétisées, à partir de la tyrosine, selon d'autres voies métaboliques (schéma 2).



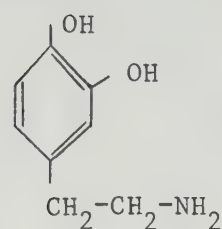
tyrosine

tyrosine hydroxylase



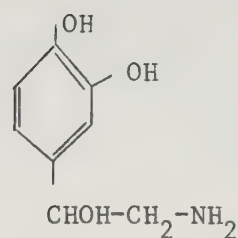
DOPA

DOPA décarboxylase



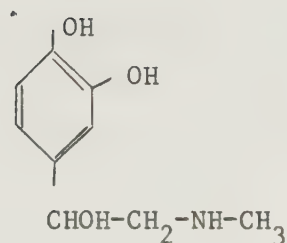
Dopamine

Dopamine β oxydase



Noradrénaline

*N méthyl phényléthanol
amine transférase (PNMT)*



Adrénaline

1ère voie accessoire

tyrosine → tyramine → octopamine → noradrénaline → adrénaline

2ème voie accessoire

tyrosine → tyramine → octopamine → p. sympathol → adrénaline

3ème voie accessoire

tyrosine → tyramine → dopamine → noradrénaline → adrénaline

4ème voie accessoire

tyrosine → DOPA → dopamine → épinine → adrénaline

5ème voie accessoire

tyrosine → DOPA → dihydroxyphénylsérine → noradrénaline → adrénaline

Ces différentes étapes enzymatiques sont souvent extra-glandulaires et, si la plupart ont été mises en évidence in vitro, leur existence in vivo reste encore souvent à démontrer.

En ce qui nous concerne, le problème est de connaître d'une part les possibilités de transformation de la dopamine, d'autre part les précurseurs immédiats de la noradrénaline. Les séquences décrites ci-dessus montrent que la dopamine peut se transformer soit en noradrénaline, soit en épinine; la noradrénaline peut provenir soit de la dopamine, soit de l'octopamine, soit de la dihydroxyphénylsérine.

2/ REALITE DE CES TRANSFORMATIONS -

a) Transformation de l'octopamine en noradrénaline.

L'octopamine a été découverte pour la première fois par Erspamer et Boretti en 1951 en tant que constituant normal des glandes salivaires du *Cephalopode Octopus octopus*.

L'octopamine est un constituant normal des urines humaines : 0,1 µg d'octopamine libre ou conjuguée/mg de créatinine (Kakimoto et Armstrong, 1962), 400 µg/24 h. (Pisano et al., 1961). Elle est présente dans les terminaisons nerveuses (Molinoff et Axelrod, 1969) des tissus de rat à innervation sympathique.

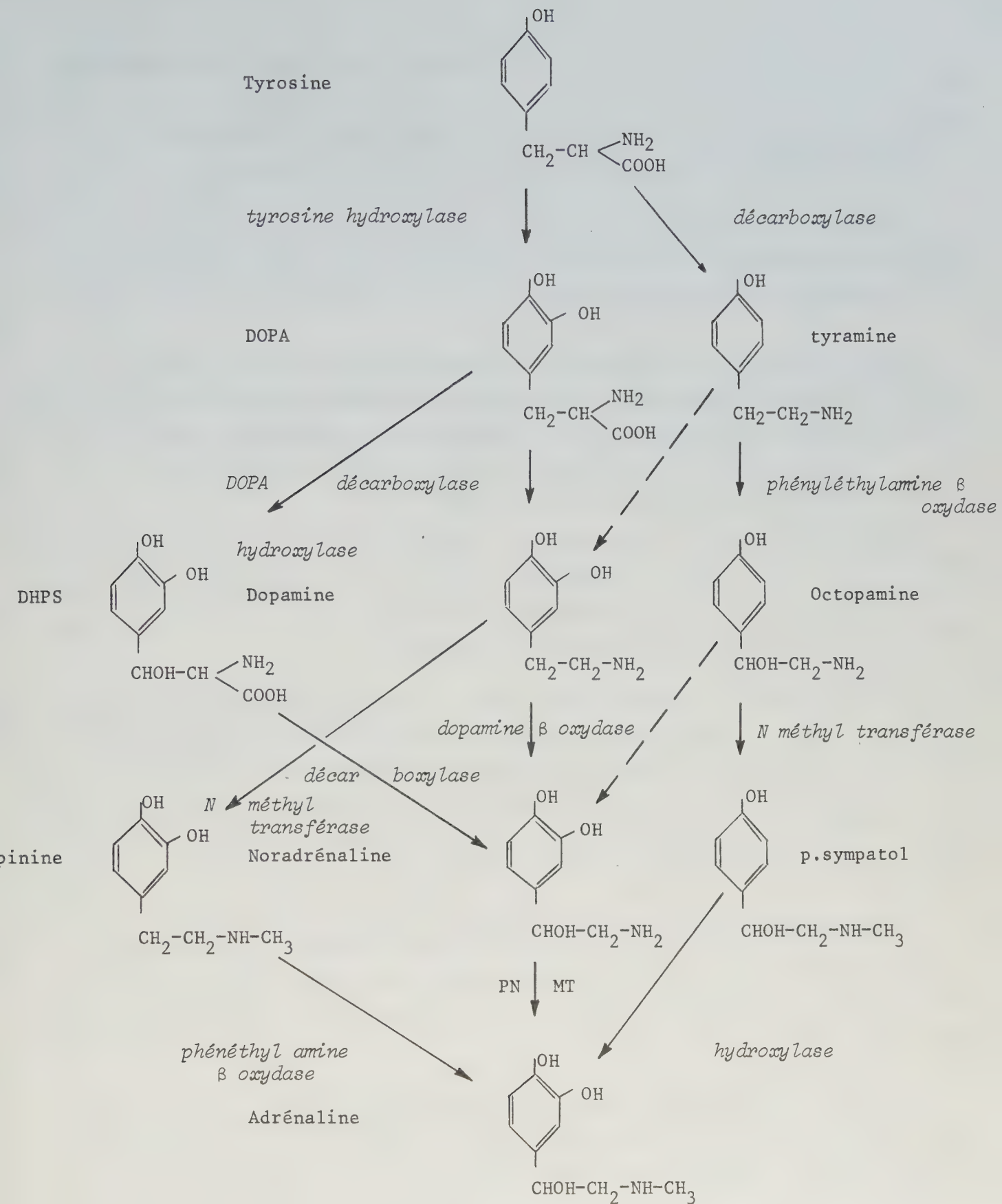


Schéma 2 - Voies accessoires de la biosynthèse de l'Adrénaline

L'administration d'octopamine ^{14}C s'accompagne, chez le Rat, d'une excrétion de trace de noradrénaline ^{14}C (Creveling et al., 1962b) et il semble que cette transformation soit uniquement extra-surrénale car aucune trace de noradrénaline et d'adrénaline marquées ne se retrouve dans la glande médullosurrénale.

La présence d'octopamine à côté de la noradrénaline dans les glandes salivaires de l'Octopus (Erspamer et Boretti, 1951) laisse penser qu'elle serait le précurseur de la noradrénaline chez cet Invertébré.

Cette transformation octopamine $\longrightarrow$ noradrénaline est sous la dépendance d'une hydroxylase hépatique microsomiale (Lemberger et al., 1963), système enzymatique hydroxylant aussi bien l'octopamine que les tyramines et sympathols.

b) Transformation de la dopamine en épinine.

La mise en évidence de l'épinine dans la glande parotide du Crapaud *Bufo Marinus* (Marki et al., 1962) à côté de la dopamine, noradrénaline et adrénaline laisse penser que l'épinine pourrait être un intermédiaire métabolique entre la dopamine et l'adrénaline; mais aucune étude n'a confirmé cette hypothèse.

Un travail récent de Laduron (1972) montre la réalité de cette transformation in vitro dans la glande médullosurrénale de Boeuf. L'enzyme de méthylation (PNMT) peut N méthyler la dopamine; cependant, cette enzyme a une moins forte affinité pour la dopamine que pour la noradrénaline (K_m pour la dopamine : 2.10^{-3} M et K_m pour la noradrénaline : 5.10^{-6} M). Cette étape enzymatique remet en question les stades intra-cellulaires de biosynthèse de l'adrénaline (Laduron, 1972).

c) Transformation de la DOPA en dihydroxyphénylsérine puis en noradrénaline.

Les structures nerveuses des Annélides (*Lumbricus Terrestris*) contiennent une amine dont les caractéristiques spectrales seraient celles de la dihydroxyphénylsérine (Corrodi et Jonsson, 1967).

Le rôle de la dihydroxyphénylsérine, en tant qu'intermédiaire de synthèse, est encore discuté car la DOPA ^{14}C ne fournit jamais de DHPS ^{14}C dans les coupes de médullosurrénale de Mammifères (Kirshner, 1957).

Cependant la DHPS administrée au Lapin est métabolisée dans les urines sous forme de noradrénaline et la décarboxylation a été démontrée in vitro dans les tissus à innervation sympathique (en particulier dans le rein de Cobaye).

II - CONCLUSION -

Dans la glande médullosurrénale de Mammifères, la voie de biosynthèse de l'adrénaline, à partir de la tyrosine, proposée par Blaschko paraît être la plus probable. Cependant, des voies accessoires de synthèse peuvent prendre une place plus ou moins grande dans le règne animal et leur importance est à souligner dans la mesure où le p. sympatol et l'épinine pourraient être précurseurs de l'adrénaline et l'octopamine et la dihydroxyphénylsérine précurseurs de la noradrénaline.

Aussi, il faut considérer le schéma de Blaschko avec nuance : il a été prouvé, en effet, que l'adrénaline peut se former dans la médullosurrénale de Boeuf in vitro à partir de l'épinine et il semble que la noradrénaline des glandes salivaires de l'Octopus pourrait être le produit d'hydroxylation de l'octopamine.

CHAPITRE II

LA DOPAMINE DANS LE RÈGNE ANIMAL

I - LA DOPAMINE CHEZ LES MAMMIFÈRES -

1/ REPARTITION TISSULAIRE -

La dopamine est largement répandue dans les tissus de Mammifères et sa concentration varie d'un organe à l'autre (tableau I). Sa répartition topographique pour une même espèce est très inégale; elle ne constitue qu'une faible partie de la concentration totale en catécholamines dans la glande médullosurrénale, mais dans certains tissus centraux (striatum) ou périphériques (poumon - intestin) elle est nettement prépondérante. Certaines cellules, les "*mast cells*" de la littérature anglaise ont la particularité de ne contenir que de la dopamine.

2/ LOCALISATION CELLULAIRE -

La dopamine de la glande médullosurrénale et des fibres orthosympathiques est contenue dans des structures cytoplasmiques particulières (Eade, 1958; Schumann, 1958; Lishajko, 1968-1969) : les granules chromaffines de la glande ou les vésicules synaptiques des fibres. Ces deux types de structures présentent de nombreuses analogies (Potter et Axelrod, 1963; Banks et Helle, 1971)

- prise en charge des catécholamines sous la dépendance de l'ATP et de Mg^{++}
- stockage des catécholamines principalement sous forme d'un complexe avec l'ATP et des protéines
- présence d'une protéine soluble, la chromogranine A et d'une protéine enzymatique, la dopamine β oxydase
- décharge des catécholamines sous la dépendance de l'ion Ca^{++} .

Bien que ces structures diffèrent (tableau II) quant à leur taille, densité, elles ont cependant les mêmes fonctions physiologiques essentielles : synthèse, stockage et sécrétion des catécholamines.

TABLEAU I : LA DOPAMINE CHEZ LES MAMMIFERES

TISSUS	ESPECES	OHT $\mu\text{g/g}$	OHT	REFERENCES
			DOPA + A + NA + OHT ^x 100	
<u>MÉDULLO-SURRÉNALE</u>				
Sujets endartéritiques	Homme	0,80	0,38 %	Van Der MEULEN et al. 1969
		0,21	0,02 %	" "
Sujets polytraumatisés	Homme	0,09	0,013%	" "
		0,25	0,052%	" "
Tumeurs chromaffines	Homme	14	1,00 %	" "
		32	0,5 %	" "
Tumeurs sympathiques				
x sans signes secondaires	Homme (enfants)	4,2	16,00 %	PEYRIN non publié
x avec diarrhée	"	12,2	25,00 %	"
x avec hypertension	"	2,07	43,00 %	"
<u>MÉDULLO-SURRÉNALE</u>				
	Mouton	350	9,7 %	SHEPHERD , WEST 1953
	Boeuf	35	0,6 %	"
	Vache	17	0,3 %	"
	Brebis	valeur non précisée	2,0 %	DENGLER 1957
<u>CERVEAU ENTIER</u>				
	Homme	0,94	78,0 %	MONTAGU 1963
		0,20	45,0 %	"
	Lapin	0,32	52,0 %	BERTLER , ROSENGREN 1959 _a
	Rat	0,52	69,0 %	MONTAGU 1963
	Cobaye	0,38	72,0 %	MONTAGU 1963
	Chien	0,19	52,0 %	BERTLER , ROSENGREN 1959 _a
<u>NOYAU CAUDÉ</u>				
	Homme	5,74	99,8 %	SANO et al. 1959
	Chèvre	10,9	100,0 %	LAVERTY , SHARMAN 1965
	Chat	9,9	99,0 %	"
	Chien	9,9	99,0 %	"
	Rat	6,39	99,5 %	"
<u>HYPOTHALAMUS</u>				
	Homme	1,12	50,0 %	SANO et al. 1959
	Chat	0,20	6,0 %	LAVERTY , SHARMAN 1965
	Chien	0,25	16,0 %	"
	Rat	0,14	9,9 %	"
	Lapin	0,20	12,0 %	"
	Mouton	0,21	13,0 %	"
	Chèvre	0,11	4,8 %	"
<u>TERMINAISONS NERVEUSES SPLÉNIQUES</u>				
	Boeuf	non précisé	50,0 %	SCHUMANN 1956
	Chien	0,45	3,6 %	LAVERTY , SHARMAN 1965
<u>GANGLION ÉTOILÉ</u>				
	Boeuf	non précisé	50,0 %	SCHUMANN 1956
	Mouton	non précisé	27,0 %	LAVERTY , SHARMAN 1965
<u>REINS</u>				
	Rat	0,03	18,7 %	ANTON , SAYRE 1964
	Cobaye	0,04	6,8 %	"
	Lapin	0,02	10,0 %	"
	Chien	0,03	7,5 %	"
	Chat	0,07	18,0 %	"
<u>POUMONS, BRONCHES</u>				
	Boeuf	0,5 - 1,9	98,0 %	EULER, LISHAJKO 1957
<u>MOELLE ÉPINIÈRE</u>				
	Homme	0,32	40,0 %	Mc GEER , Mc GEER 1962
	Lapin	0,84	63,0 %	"
	Rat	1,0	54,0 %	"
	Chat	0,45	43,0 %	"
<u>URINES</u>				
	Homme adulte	26,3 $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ créatinine		PEYRIN non publié
	Enfant	252 $\mu\text{g}/24 \text{ h.}$		
<u>PANCREAS</u>				
	Mouton		50,0 %	SCHUMANN 1956
	Chien		50,0 %	"
	Brebis	0,62	72,0 %	SCHUMANN 1959
	Boeuf	0,20	59,0 %	"
<u>COLON</u>				
	Chien	0,3	94,0 %	"
	Brebis	4,3	99,0 %	"
	Boeuf	18,3	100,0 %	"
			50,0 %	GOODALL 1951

TABLEAU II - LES DIFFÉRENTES STRUCTURES DE STOCKAGE DES CATÉCHOLAMINES -

TISSUS	STRUCTURES	DIAMETRE (Å)	FRACTIONS DE CENTRIFUGATION
Médullosurrénale	granules chromaffines	500 à 4000	fraction mitochondriale
Système ortho-sympathique et Système nerveux central	vésicules synaptiques	400 à 500	fraction microsomiale
Système nerveux central	synaptosomes	environ 1300	entre fraction mitochondriale et microsomiale

3/ ROLE DE LA DOPAMINE -

a) Précurseur de la noradrénaline.

Le rôle de la dopamine en tant que précurseur de la noradrénaline est bien établi, aussi bien dans la glande médullosurrénale (Goodall et Kirshner, 1957; Rosenfeld et al., 1958) que dans les fibres nerveuses orthosympathiques (Schümann, 1956; Kirshner, 1957, 1959a; Potter et Axelrod, 1963; Jonsson et Sachs, 1970) ou centrales (Udenfriend et al., 1966).

b) Effets physiologiques périphériques.

La stimulation de la glande perfusée de Mouton avec l'acétylcholine provoque la libération, dans le perfusat, de noradrénaline, d'adrénaline et aussi de dopamine (4 p. 100 de la concentration totale en catécholamines)(Lishajko, 1970); cette amine se comporte donc comme une substance indépendante vis à vis des autres catécholamines.

A la périphérie, les effets sont souvent qualitativement identiques à ceux de la noradrénaline : augmentation de la glycémie (Häkanson et al., 1967), du taux d'acides gras libres, du glycérol, lactate et pyruvate sanguins (Neuvonen et al., 1971a), contraction de la membrane nictitante de Chat (Balzer et Holtz, 1956) vasoconstriction du pancréas de Chien (Takeuchi et al., 1971).

Cependant, la dopamine provoque chez l'Homme et le Chien des effets vasodilatateurs au niveau des reins et de l'intestin (Goldberg, 1970; Mc NAY et al., 1965), augmente chez le Chien la sécrétion pancréatique (Takeuchi et al., 1971) et provoque des effets sur la pression artérielle, variables selon l'espèce (BURN

et Rand, 1958; Dengler, 1957; Hornykiewicz, 1958). Ces actions spécifiques de la dopamine, différentes de celles de la noradrénaline ne sont pas affectées par les agents bloquant les récepteurs α ou β (Holtz et Stock, 1963; Vanov, 1963; Mc Donald, 1963). Bien que cette amine soit encore classée parmi les agents sympathomimétiques à action directe au niveau des récepteurs classiques (Holtz et al., 1939, Ariens, 1963) il existe probablement à la périphérie des récepteurs spécifiques de la dopamine différents des récepteurs sympathomimétiques α et β (Kier et Truitt, 1970).

Le mécanisme d'action de la dopamine est encore inconnu, mais il semble que ses effets physiologiques seraient dus, soit à une action directe au niveau de récepteurs spécifiques, soit à un mécanisme d'action indirect par l'intermédiaire d'autres substances (Neuvonen et al., 1971b).

c) Effets physiologiques centraux.

La dopamine cérébrale, spécifiquement localisée (tableau I) semble être une substance physiologiquement très active.

La diminution de sa concentration au niveau des ganglions de la base (striatum, pallidum, substance noire), mise en évidence dans la maladie de Parkinson, semble être en rapport avec les troubles moteurs de rigidité et d'akinésie (Ehringer et Hornykiewicz, 1960). Ces troubles moteurs peuvent être reproduits chez l'animal dont on a vidé les stocks en dopamine cérébrale par la réserpine.

L'excitation électrique des corps cellulaires de la substance noire (York, 1970; Mc Lennan, 1965) et du noyau thalamique centromédian (Mc Lennan, 1970) provoquant la libération de la dopamine au niveau des terminaisons axoniques, respectivement du putamen et du noyau caudé, permet de penser que la dopamine serait le transmetteur synaptique de certains ganglions de la base. Cependant, aucune expérience n'a prouvé que la dopamine libérée, exerce par elle-même un effet sur le neurone suivant. Administrée spécifiquement au niveau du noyau caudé et du putamen du Chat et du Lapin, elle inhibe l'activité spontanée des neurones excitateurs qui contrôlent la motricité. Selon Hornykiewicz (1966) le rôle de la dopamine, au niveau du système nigrostriatal, serait tout d'abord de nature inhibitrice supprimant ainsi l'activité motrice de certains neurones centraux. Elle agirait en tant que substance transmettrice inhibitrice par la voie noyau caudé-thalamus (Mc Lennan, 1970).

4/ CONCLUSION -

Dans les tissus de synthèse des amines sympathomimétiques (glande médullosurrénale, fibres sympathiques, système nerveux central) la dopamine est le précurseur de la noradrénaline.

Les fortes concentrations dans certains tissus périphériques (bronche, intestin) lui font attribuer un rôle, propre, défini actuellement de façon fragmentaire; il est possible que des expériences ultérieures apportent la preuve du rôle physiologique de cette catécholamine dans les territoires où elle est prédominante.

Au niveau cérébral, le rôle de la dopamine dans la modulation de la motricité extrapyramidale paraît actuellement affirmé grâce aux nombreuses observations (biochimiques, cliniques, pharmacologiques) effectuées dans les syndromes parkinsoniens.

II - LA DOPAMINE CHEZ LES AUTRES VERTÉBRÉS -

1/ LES OISEAUX -

La dopamine a été identifiée dans divers tissus d'Oiseaux : foie, coeur, cerveau (tableau III).

La médullosurrénale de l'embryon de Poulet possède tout l'équipement enzymatique nécessaire pour transformer la DOPA en adrénaline; la séquence d'apparition des diverses enzymes impliquées dans cette synthèse suit le développement de l'embryon, la N-méthylnoradrénaline transférase étant la dernière enzyme apparue (Hagen, 1956; Burack et Badger, 1964).

2/ LES REPTILES -

De nombreux tissus de Tortue contiennent de la dopamine (tableau III).

Dans la glande médullosurrénale du Serpent *Xenodon merremii*, deux types de cellules, anatomiquement différentes, ont été mises en évidence : les unes situées à la périphérie du tissu chromaffine contiennent de la noradrénaline, et les autres, centrales, mélangées aux cellules corticales, sont riches en adrénaline (Wassermann, 1964). Dans chaque zone, la dopamine est le précurseur de la noradrénaline et de l'adrénaline (Biscardi et Donoso, 1967).

3/ LES BATRACIENS -

A partir des Batraciens, les travaux concernant l'étude de la dopamine se résument à une mise en évidence de cette amine dans les tissus. Le rôle précurseur de la dopamine vis à vis de la noradrénaline n'a pas été étudié.

TABLEAU III - LA DOPAMINE CHEZ LES VERTEBPES

ANIMAUX	TISSUS	OHT $\mu\text{g/g}$	NA ($\mu\text{g/g}$)	A ($\mu\text{g/g}$)	$\frac{\text{OHT}}{\text{OHT}+\text{NA}+\text{A}} \times 100$	REFERENCES
MAUX						
Pigeon	foie	0,13	0,24	0,02	33 %	ANTON, SAYRE 1964
	coeur	0,09	0,74	0,03	10 %	" "
	cerveau	0,29	0,25	0,02	53 %	" "
Poussin (Gallus domesticus)	hémisphères cérébraux					
	2ème jour	0,115	0,131	0,006	51 %	CALLINGHAM, SHARMAN 197
	8ème jour	0,354	0,218	0,006	61 %	" "
	6ème mois	0,468	0,265	0,025	71 %	" "
ILES						
Tortue	rate	44,7	0,42	0,06	99 %	ANTON, SAYRE 1964
	foie	0,60	0,04	0,06	86 %	" "
	rein	0,59	34,9	1,5	1,7%	" "
	coeur	0,11	0,43	0,09	22 %	" "
	cerveau	0,57	0,44	0,12	41 %	" "
ACIENS						
Grenouille (na Temporana)	coeur	0	0,23	0,88		OSTLUND, 1954
	rate	0	0,63	0,29		"
	foie	0	0,03	0,05		"
	médullosurrénale	0	257	134		"
Crapaud (fo marinus)	venin	dopamine ++ épinine +	+	++++		MARKI et al. 1962
SONS						
LEOSTEENS						
Brochet (Esox Lucius)	coeur		0,060	0,041		EULER, 1953
	foie	non recherchée	0,027	0,035		"
	rate		0,025	0,039		"
LACIENS						
Squale (Squalus Acanthias)	tissu chromaffine	non recherchée	6800	2800		EULER, 1953
Roussette (Scyliorhinus Canicula)	tissu chromaffine	non recherchée	1800	2330		PEYRIN, 1967
	coeur		15,5	0,83		"
	reins		4,8	0,16		"
	plasma		124,7 $\mu\text{g/l}$	22,9 $\mu\text{g/l}$		"
Scyliorhinus (Stellaris)	tissu chromaffine	non recherchée	6300-9700	4600-8600		
OSTOMES						
Lamp to ie (ampetra fluviatilis)	coeur	0	140	56		DAHL et al. 1971
	sinus veineux	0	4,1	84		"
	atrium					

Le venin de Crapaud (*Bufo marinus*) contient de la dopamine, de l'épinépine, de la noradrénaline et de l'adrénaline (tableau III) ainsi que les enzymes nécessaires à la O- ou N- méthylation de ces amines (Marki et al., 1962). Le rôle respectif de ces composés reste à étudier. Chez la Grenouille, le médiateur chimique du système sympathique est l'adrénaline et non pas la noradrénaline comme chez le Mammifère (Falck et al., 1963).

4/ LES POISSONS

a) Poissons Téléostéens.

Les cellules chromaffines sont associées, soit avec les ganglions de la chaîne sympathique, soit avec les cellules interrénales et, de même que chez le Vertébré supérieur, l'administration de réserpine provoque la déplétion des inclusions cytoplasmiques de ces cellules chromaffines (Yaron, 1970).

Les dosages effectués dans les ganglions sympathiques de Brochet (*Lucioperca lucioperca*) et de Morue (*Gadus callarias*) ont montré une prédominance d'adrénaline, alors que la rate, le cœur et le cerveau contiennent surtout de la noradrénaline (Östlund, 1954, Euler et Fänge, 1961).

b) Poissons Sélaciens.

Le tissu chromaffine, formé d'une double série linéaire d'éléments glandulaires le long de l'axe aortique, contient de la noradrénaline et de l'adrénaline en proportion variable suivant les espèces. Les méthodes histochimiques ont montré que les cellules à noradrénaline sont localisées au centre de l'organe, alors que celles à adrénaline sont périphériques.

Chez la Roussette, la noradrénaline se transforme in vivo en adrénaline (Peyrin, 1967) et le tissu chromaffine est apte à synthétiser in vitro l'adrénaline ^{14}C à partir de la noradrénaline ^{14}C en présence de S adénosylméthionine, comme chez le Mammifère (Peyrin et al., 1972a). Cependant, bien que la localisation de l'enzyme de méthylation (PNMT) de la Roussette soit cytoplasmique comme celle du Rat, les propriétés physicochimiques des deux enzymes diffèrent (pH, température, force ionique, thermostabilité) (Peyrin et al., 1972b).

Chez les Poissons, jusqu'à ce jour et à ma connaissance, aucun travail ne concerne la dopamine, ni en tant que substance physiologiquement active, ni en tant que précurseur de la noradrénaline présente.

5/ LES CYCLOSTOMES -

Les méthodes histochimiques et fluorimétriques ont mis en évidence de fortes quantités de noradrénaline et d'adrénaline dans le coeur de la Lamproie (tableau III), sans trace de dopamine.

Les cellules cardiaques contiennent des granules qui, à la microscopie électronique, sont identiques à ceux qui stockent les catécholamines dans les cellules chromaffines des Vertébrés supérieurs (Bloom et al., 1961).

III - LA DOPAMINE CHEZ LES INVERTÉBRÉS -

La dopamine est fortement concentrée dans les tissus des Invertébrés (tableau IV).

1/ LES ECHINODERMES -

Elle est distribuée dans le tissu nerveux de l'Oursin et de l'Etoile de Mer, à côté de faibles quantités de noradrénaline (tableau IV). Cottrell, en 1967, n'a pas trouvé d'adrénaline chez ces espèces.

2/ LES ARTHROPODES -

a) Les Insectes.

Dès 1954, Östlund montre que la dopamine est fortement distribuée dans tout le corps des Insectes à une concentration variable selon l'état larvaire ou la forme adulte. C'est la catécholamine prédominante chez de nombreuses espèces (tableau IV).

La synthèse et le métabolisme de la dopamine chez l'Insecte présentent des caractéristiques particulières (Sekeris et Karlson, 1966). Comme chez le Mammifère, elle dérive essentiellement de la DOPA, bien qu'une faible partie provienne de la tyramine; par contre, en ce qui concerne les transformations ultérieures, seule une faible quantité est désaminée en acide dihydroxyphénylacétique et la majeure partie se transforme en N-acétyl-dopamine, substance entrant dans la composition du tanin de la cuticule. Le corps de l'Insecte contient de la noradrénaline, mais le rôle précurseur de la dopamine n'a pas été étudié. Des travaux récents suggèrent que, chez la Blatte (*Periplaneta americana*) l'octopamine synthétisée dans l'hémolymphe pourrait être le précurseur de la noradrénaline (Lake et al., 1970).

TABLEAU N° IV - LA DOPAMINE CHEZ LES INVERTEBRES -

Animaux	Tissus	OHT μ g/g	NA μ g/g	A μ g/g	$\frac{\text{OHT}}{\text{OHT} + \text{NA} + \text{A}} \times 100$	Références
<u>ARTHROPODES</u>						
<u>Insectes</u>						
Blatte (Periplaneta americana)	cerveau	2,5	0,37	0	87 %	FRONTALI, HAGGENDAL
Trichoptera (Anabolia nervosa)	thorax	5,1	0,75	0	87 %	BJORKLUND, FALCK & KLEMM, 1970
" "	tête	3,5	0,29	0	92 %	KLEMM, BJORKLUND
Tenebrio molitor (larve)	corps entier	12,5	2,2	0,061		OSTLUND, 1954
Apis mellifera (larve)	corps entier	3	0,30	0,01		OSTLUND, 1954
<u>Crustacés</u>						
Crabe (Carcinus maenas)	cerveau	7,3	0	0	100 %	KERKUT, SEDDEN & WALKER, 1966
<u>MOLLUSQUES</u>						
<u>Lamellibranches</u>						
Spirula solida	ganglions nerveux	45	5,5	0	89 %	COTTRELL, 1967
Mercenaria mercenaria	tissu nerveux	261	0	0	100 %	SWEENEY, 1963
<u>Cephalopodes</u>						
Eledone cirrhosa	cerveau	10,5	3,5	0	75 %	COTTRELL, 1967
<u>Gastéropodes</u>						
Hélix aspersa	tissu nerveux	50	5	0	90 %	SWEENEY, 1963
<u>ECHINODERMES</u>						
Oursin - Echinus esculentus	nerf radial	5	2,5	0	66 %	COTTRELL, 1967
Etoile de Mer - Asterias rubens	nerf radial	5,5	1,2	0	82 %	" "
<u>ANNELIDES</u>						
Ver de terre Lumbricus terrestris	corde nerveuse ventrale	3	1,5	valeur non précisée	66 %	RUDE, 1969a
Vers plats Dugesia tigrina	corps entier	1,3	0,9	0	59 %	WELSH, KING 1970
Protocyla fluviatilis	corps entier	1,7	0,2	0	89 %	WELSH, KING 1970
Phagocata oregonensis	corps entier	0,6	0	0	100 %	WELSH, KING 1970
<u>COELENTERÉS</u>						
Anémone de Mer Actinia equina	extraits globaux	0,014	0,0047	0	75 %	CARLYLE, 1969

La dopamine a des propriétés excitatrices sur le coeur de la Blatte in vitro (Miller et Metcalf, 1968) et, selon Klemm et Björklund (1971) cette catécholamine jouerait un rôle dans la neurotransmission.

b) Les Crustacés.

La dopamine, seule catécholamine présente dans le tissu nerveux du Crustacé *Carcinus maenas* serait une substance neurotransmettrice (Murdock, 1971). C'est un inhibiteur puissant des récepteurs des Langoustes *Pacifastacus leniusculus* et *Procambarus clarkii*.

3/ LES MOLLUSQUES -

La dopamine est présente dans les tissus d'une grande variété de Mollusques et, dans le cerveau et les ganglions viscéraux c'est souvent la seule catécholamine présente (Tableau IV).

a) Les Gastéropodes.

La DOPA, ajoutée in vitro au tissu nerveux de l'Escargot *Hélix pomatia* (Cardot, 1963) ou injectée in vivo chez *Hélix aspersa* (Cottrell, 1967) peut se transformer en dopamine. La concentration dans les ganglions nerveux diminue sous l'action de la réserpine (Kerkut et al., 1966).

L'activité électrophysiologique des cellules nerveuses, étudiée in vitro et in vivo (Kerkut et Walker, 1961; Gerschenfeld, 1964), est fortement inhibée par la dopamine, alors que la noradrénaline et l'adrénaline ont des effets mixtes ou excitateurs sur ces mêmes cellules. Ce rôle de la dopamine dans l'inhibition de l'activité neuronale est à rapprocher de celui mis en évidence chez le Mammifère.

b) Lamellibranches.

Le système nerveux de *Mercenaria mercenaria* et *Mytilus* ne contient que de la dopamine (tableau IV).

c) Céphalopodes. (Tableau IV)

Les extraits des glandes salivaires postérieures du Poulpe *Octopus octopus* contiennent un mélange de différentes amines dont la 5 hydroxytryptamine, la tyramine, l'octopamine et la dopamine (Erspamer et Boretti, 1951) et d'autres amines non identifiées.

Chez les Mollusques, la dopamine est liée à la fraction particulière des cellules du système nerveux et joue certainement le rôle d'une substance nerveuse médiatrice (Cottrell, 1967).

4/ LES ANNELIDES -

Chez le Ver de terre *Lumbricus terrestris* l'analyse chimique des neurones de la corde ventrale révèle une concentration en dopamine deux fois supérieure à celle de la noradrénaline (Myhrberg, 1967; Rude, 1969; Ehinger et Myhrberg, 1971).

La dopamine est l'amine nettement prédominante chez trois espèces de Planaires étudiées par Welsh et King (1970). Les neurones de ces Annélides contiennent des granules à caractère neurosécrétoire (Oosaki, 1965). Dans les ganglions cérébraux de l'espèce *Phagocata oregonensis*, en particulier, quatre types de cellules contenant des catécholamines (noradrénaline et dopamine) sont différenciés dans une fonction certainement sensorielle et motrice (Welsh et Williams, 1970).

5/ LES COELENTERES -

Des extraits d'Anémone de Mer *Actinia equina* contiennent de la DOPA, dopamine, noradrénaline (Carlyle, 1969).

Chez ce Coelentéré, les catécholamines ont été localisées dans les cellules sensorielles et certainement sensori-motrices au niveau des tentacules (Dahl et al., 1963). Ainsi, les cellules les plus primitives au point de vue zoologique, différenciées dans une fonction sensorielle, contiennent de la noradrénaline et de la dopamine.

VI - CONCLUSION -

L'étude phylogénique de la dopamine tissulaire montre que cette amine est très largement répandue dans tout le règne animal. Au fur et à mesure que l'on descend dans l'échelle animale, la dopamine prend une place de plus en plus grande et elle devient la catécholamine prédominante chez les Invertébrés.

Sa forte concentration dans le cerveau, constante dans tout le règne animal, est à souligner; elle fournit des arguments en faveur d'un rôle neurophysiologique propre de cette amine. Ses effets inhibiteurs de l'activité neuronale qui se traduisent chez le Mammifère par le maintien de l'activité extrapyramidale motrice normale ont été retrouvés, in vitro, dans certaines cellules nerveuses des êtres inférieurs (Mollusques, Crustacés). De plus, chez les Annélides et les Coelentérés, la dopamine joue peut être un rôle dans les cellules à différenciation sensorielle et motrice.

Son rôle précurseur de la noradrénaline n'est prouvé que chez les Mammifères, Oiseaux et Reptiles.

Par contre, à ce jour, l'étape dopamine $\longrightarrow$ noradrénaline ne semble pas obligatoire chez un grand nombre de Vertébrés inférieurs et d'Invertébrés. Ainsi, la présence d'épinine chez le Crapaud, de N-acétyl-dopamine chez l'Insecte, d'octopamine chez le Poulpe et l'Insecte, posent le problème de l'existence de cette étape pour certaines espèces.

Pour l'ensemble du règne animal, les possibilités de transformation de la dopamine et les précurseurs possibles de la noradrénaline peuvent se résumer selon les schémas 3 et 4.

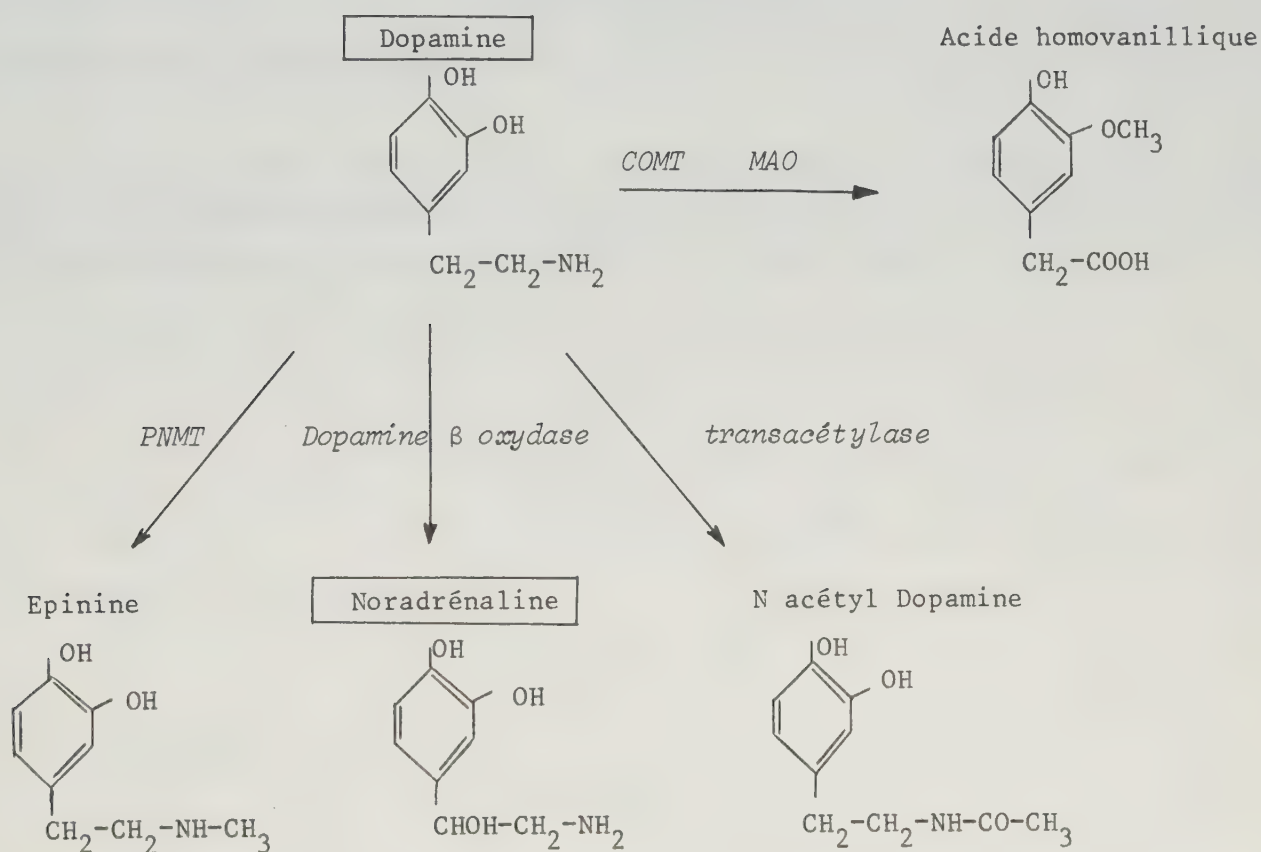
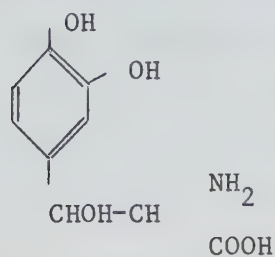
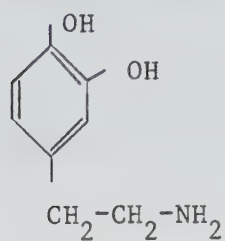


Schéma 3 - Les possibilités de transformation de la Dopamine

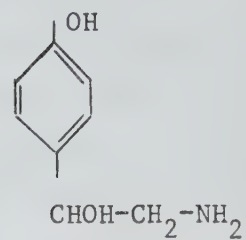
Dihydroxyphénylsérine



Dopamine



Octopamine



décarboxylase

dopamine β oxydase

hydroxylase

Noradrénaline

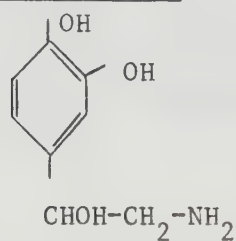


Schéma 4 - Les différents précurseurs possibles de la noradrénaline

CHAPITRE III

LA DOPAMINE β OXYDASE EC. 1.14.2.1

L'enzyme dopamine β oxydase, ou phényléthylamine β hydroxylase, réalise en particulier la transformation de la dopamine en noradrénaline. Elle fut isolée de la pulpe de banane par Kirshner en 1959 puis, de la glande médullosurrénale de Boeuf par Levin et Kaufman en 1961. Cette enzyme est présente dans de nombreux tissus de Mammifères, en particulier dans le coeur, le foie, les reins, le cerveau (Spector et al., 1963; Udenfriend et Creveling, 1959).

I - CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES -

Les propriétés physicochimiques de la dopamine β oxydase de la médullosurrénale de Boeuf ont été étudiées par Friedman et Kaufman (1965a, 1965b) pour l'enzyme particulaire et par Kirshner et Kirshner (1971) pour l'enzyme soluble.

Elles peuvent se résumer ainsi :

	Enzyme particulaire	Enzyme soluble
P.M.	290.000	273.000
S ₂₀ , w	8,93 en milieu NaCl M	8,6 en milieu NaCl 0,1 M
Activité enzymatique moléculaire	1,06 moles de dopamine transformées par mole d'enzyme/mn	
Groupement prosthétique	Cu ⁺ ou Cu ⁺⁺ 0,65 à 1 μ g de cuivre/ mg de protéine	

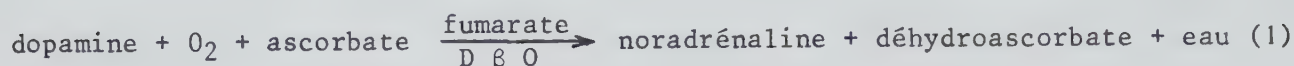
II - LES ETAPES DE LA REACTION ENZYMATIQUE -

L'équation générale des hydroxylations est la suivante :



dans laquelle RH est le substrat et ROH le produit de la réaction.

Lorsque la dopamine est transformée en noradrénaline, sous l'action de la dopamine β oxydase, les constituants de la réaction sont les suivants (Levin et al., 1960) :



La dopamine β oxydase est une oxydase à fonction mixte parce que :

- l'oxygène de l'air est une meilleure source d'oxygène que l'eau pour hydroxyler le carbone β de la dopamine,

- le donneur d'électrons (l'ascorbate) est oxydé stœchiométriquement durant cette réaction d'hydroxylation. Un atome d'oxygène participe à la formation d'une molécule de noradrénaline alors que l'autre atome oxyde une molécule d'acide ascorbique (équation 1).

Le mécanisme par lequel le substrat, l'oxygène et l'ascorbate interagissent avec l'enzyme a été étudié par Friedman et Kaufman (1965b) in vitro. Les principaux points sont les suivants :

- en l'absence de substrat, l'enzyme peut rapidement oxyder une quantité équivalente d'ascorbate, entraînant la formation de déhydroascorbate et d'enzyme réduit. Le cuivre passe alors de l'état cuivrique à l'état cuivreux (réaction a);

- cette forme réduite de l'enzyme est un intermédiaire qui réagit avec le substrat pour former le produit hydroxylé de la réaction. Simultanément, le cuivre réduit de l'enzyme se réoxyde (réaction b). Ces changements dans la valence du cuivre ont été confirmés par résonance paramagnétique.

réaction a

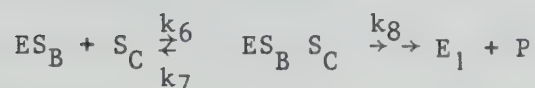
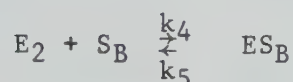
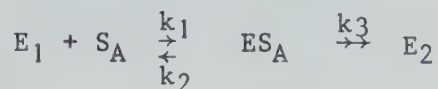


réaction b



Cependant, ce schéma général de réactions est incomplet car la chronologie des étapes entre l'enzyme réduite, le substrat et l'oxygène n'est pas connue.

Selon les études de cinétique enzymatique de Goldstein et al. (1968) la réaction s'effectue en une série d'étapes avec huit constantes de vitesse et trois complexes enzyme-substrat intermédiaires.



- E_1 : enzyme oxydée
 E_2 : enzyme réduite
 S_A : ascorbate
 S_B : O_2 ou RH
 S_C : O_2 ou RH
 $ES_A, ES_B, ES_B S_C$: complexes enzyme-substrat

En conclusion : une mole d'enzyme dopamine β oxydase peut oxyder une mole d'ascorbate en déhydroascorbate en absence de substrat, et se transformer en une forme réduite stable;

puis l'enzyme réduite réagit avec le substrat et l'oxygène pour former le composé hydroxylé;

durant cette réaction d'hydroxylation, le cuivre du groupement prosthétique de l'enzyme à l'état Cu^{++} , subit successivement une réduction et une oxydation.

III - SPECIFICITE DE L'ENZYME -

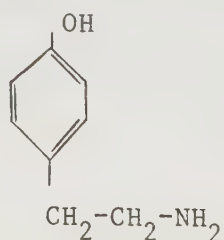
La dopamine β oxydase catalyse la β hydroxylation de nombreux composés aminés (Goldstein et Contrera, 1962a; Creveling et al., 1962b).

Tableau 5 - Activité relative de la dopamine β oxydase pour différents substrats
(Creveling, Daly et al., 1962)

Substrats	Activité relative
p tyramine	100
m tyramine	60-80
o tyramine	0
dopamine	85-90
epinine	25
N méthyltyramine	25
N-N diméthyltyramine	0
α méthyltyramine	60-70
α méthyldopamine	50-60
3 méthoxytyramine	50-70
3-5 diméthoxytyramine	25-30
3-4-5 triméthoxy β	2-5
phénéthylamine (mescaline)	
β phénéthylamine	10-15
α phénylpropylamine	2-5
ethylbenzène	0
p tyrosine	0
N acétyltyramine	0
tryptamine	0
5 hydroxytryptamine	0

Il résulte de ce tableau que toutes les phényléthylamines peuvent être des substrats.

La meilleure structure chimique pour la dopamine β oxydase, lorsque l'enzyme est utilisée à pH 5,5, est celle de la tyramine,



c'est-à-dire une phényléthylamine hydroxylée en para et sans substitutions latérales.

IV - LOCALISATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

1/ LES GRANULES -

a) Nature -

Les granules contenus dans le tissu chromaffine de la glande médullosurrénale sont des structures cytoplasmiques très individualisées. Le réticulum endoplasmique, dont la différenciation la plus importante est l'appareil de Golgi, est responsable de leur formation.

Lorsque la centrifugation différentielle de l'homogénat de tissu s'effectue en milieu saccharose isotonique 0,3 M, les granules sédimentent avec la fraction mitochondriale. Cependant, ce sont des structures différentes des lysosomes et des mitochondries (Blaschko et al., 1965) et on peut les séparer par centrifugation en gradient de densité (Laduron et Belpaire, 1968); ils représentent 25 à 29 p.100 du poids frais de la médullosurrénale.

b) Composition.

Les granules chromaffines contiennent une forte quantité d'ATP (300 µg par mg de protéine) telle, que le rapport $\frac{\text{catécholamines}}{\text{A T P}}$ est approximativement égal à $\frac{4}{1}$ (Hillarø, 1959); ce complexe constitue la principale forme de stockage des catécholamines dans les granules.

Ils sont également constitués d'une protéine enzymatique, la dopamine β oxydase, et de protéines hydrosolubles (1/3 du poids sec) dont 30 à 40 p.100 sont représentés par une protéine homogène : la chromogranine A (Kirshner et Kirshner, 1971).

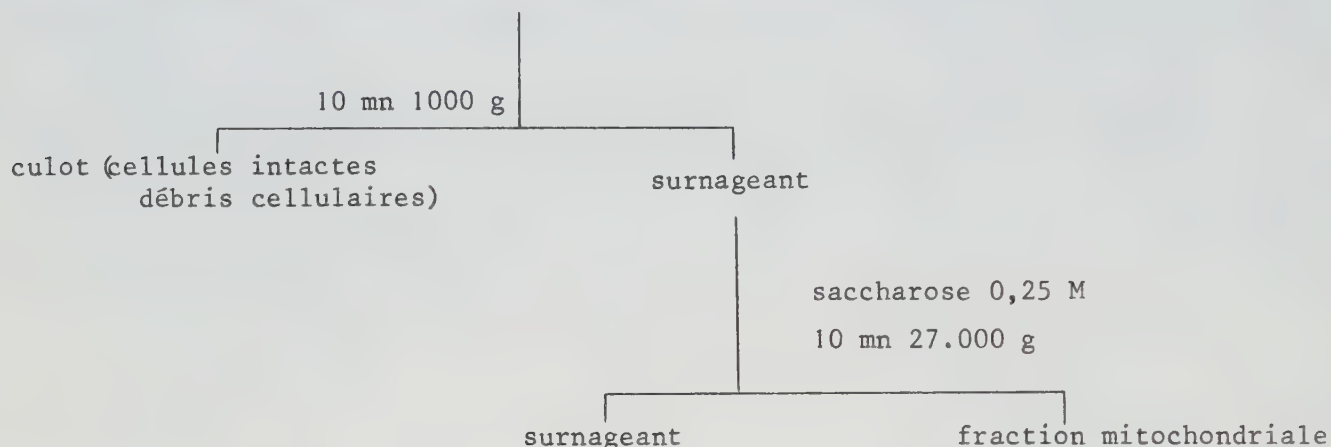
Dans la cellule chromaffine, ces granules forment un véritable sac. Ils sont entourés d'une membrane semi-perméable, composée essentiellement de phospholipides, de cytochrome b-559, de l'enzyme dopamine β oxydase et douée d'une activité ATPasique. Cette activité ATPasique membranaire pourrait intervenir dans le transport actif des catécholamines in vivo (Winkler, 1971), aussi bien pour leur stockage à l'intérieur des granules que pour leur libération sous stimulation électrique.

2/ PREPARATION D'EXTRAITS ENZYMATIQUES -

a) Fractionnement tissulaire.

Le schéma de fractionnement le plus général, permettant d'isoler une préparation enzymatique de dopamine β oxydase à partir d'un homogénat total de médullosurrénale, est le suivant :

Glande homogénéisée dans 10 volumes de saccharose 0,25 M



L'activité enzymatique est localisée dans la fraction mitochondriale, quelle que soit l'origine de l'enzyme (glande médullosurrénale ou terminaisons noradrénergiques) (Kirshner, 1957, 1959a; Stjärne et Lishajko, 1966).

b) Purification de l'enzyme.

A partir de la fraction mitochondriale, il est possible de purifier l'enzyme, après libération du contenu des granules par le cutscum, en utilisant successivement le sulfate d'ammonium et le gel de calcium (Levin et al., 1960). L'activité enzymatique est stable pendant plusieurs mois à -20°C .

3/ LOCALISATION INTRAGRANULAIRE DE L'ENZYME -

a) Répartition intragranulaire de l'enzyme.

La centrifugation à 26.000 g de la fraction mitochondriale, reprise dans le saccharose isotonique ou dans l'eau, permet de mettre en évidence une répartition de l'activité dopamine β oxydase différente, selon le milieu utilisé. Ainsi, lorsque la centrifugation s'effectue dans le saccharose isotonique, 74 p.100 de l'activité dopamine β oxydase sont localisés dans le culot; lorsqu'elle est centrifugée dans l'eau, l'activité enzymatique se répartit à raison de 22 p.100 dans le culot granu-

laire et de 77 p.100 dans le surnageant (Viveros et al., 1969a). Cette expérience prouve l'existence de deux formes enzymatiques présentes dans le granule:

- Une partie de l'enzyme est fortement liée à la membrane. Cette enzyme particulaire est utilisée comme traceur spécifique de la membrane du granule car il permet de suivre son état avant et après sécrétion des catécholamines. Dans les granules du Lapin, la moitié de l'enzyme est fermement liée à la membrane (Viveros et al., 1969a);

- Une autre partie de l'enzyme est soluble, et peut être libérée à l'extérieur du compartiment granulaire avec les catécholamines lorsque la glande est soumise à une stimulation nerveuse (Viveros et al., 1968, 1969a).

b) Forme latente de l'enzyme.

Dans la fraction mitochondriale d'un homogénat de médullosurrénale de Boeuf, l'activité dopamine β oxydase est faible du fait de l'existence de l'enzyme sous une forme latente (activité libre). L'activité enzymatique peut être considérablement accrue (activité totale) au moyen de différents procédés d'activation tels que le choc osmotique, le Triton X 100, le refroidissement et le réchauffement (Belpaire et Laduron, 1968). L'enzyme se libérerait ainsi progressivement du granule. Les résultats de ces expériences d'activation suggèrent qu'une barrière rend difficile l'accessibilité du substrat à l'enzyme; cette barrière est représentée, in vitro, par la membrane granulaire (Belpaire et Laduron, 1970).

V - LES INHIBITEURS -

1/ LES INHIBITEURS EXOGENES -

a) Les agents de chélation.

Les agents chélateurs, tels que l'EDTA (Goldstein et Contrera, 1962b), les tropolones (Goldstein et al., 1964b), le diethyldithiocarbamate (Goldstein et al., 1964a), inhibent l'activité dopamine β oxydase en formant un complexe stable avec le cuivre du groupement prosthétique de l'enzyme.

b) Les métaux.

Le cuivre Cu^{++} , ajouté en excès au milieu d'incubation in vitro (2.10^{-4}M) inhibe de 60 à 80 p.100 l'étape de β hydroxylation (Goldstein et al., 1965).

c) Les analogues structuraux.

Les phényléthylamines ($C_6H_5-CH_2-CH_2-NH_2$) et leurs isostères benzylhydrazines ($C_6H_5-CH_2-NH-NH_2$) et O-benzylhydroxylamines ($C_6H_5-CH_2-O-NH_2$) sont des inhibiteurs compétitifs de la dopamine β oxydase (Creveling, Daly et al., 1962; Van der Schoot et al., 1963).

d) Les composés sulfhydryls.

La cystéine, le glutathion, le coenzyme A, le mercaptoéthanol, à une concentration de $10^{-3}M$ et utilisés en présence de dopamine β oxydase purifiée et de tyramine inhibent l'étape de β hydroxylation à 100 p.100. Cette inhibition est de type non compétitif et elle serait due à la chélation de l'atome de cuivre du groupement prosthétique de l'enzyme in situ par les groupes SH (Nagatsu et al., 1967). L'inhibition produite par ces composés peut être levée par dialyse contre du tampon phosphate 0,05 M pH 6,5 ou évitée soit par préincubation du milieu avec de la N éthylmaléimide, réactif qui bloque les groupes SH, soit par addition de cuivre Cu^{++} .

2/ LES INHIBITEURS ENDOGENES -

a) Nature chimique.

Les tissus animaux (médullosurrénale, cerveau, coeur, rate, foie) (Nagatsu et al., 1967) contiennent des inhibiteurs naturels de la dopamine β oxydase. Au cours des différentes étapes de solubilisation de l'enzyme avec un détergent non ionique (le cutscum) et de purification ultérieure, Levin et al., (1960) trouvaient une augmentation de l'activité enzymatique et suggéraient que cette augmentation était due à l'élimination progressive d'un inhibiteur.

Le fait que l'activité enzymatique soit protégée par addition de la N éthylmaléimide en préincubation à l'homogénat de glande médullosurrénale de Boeuf laisse penser que les inhibiteurs naturels sont sans doute des composés sulfhydryls (Nagatsu et al., 1967). Leur effet inhibiteur est dix fois plus élevé que celui de la cystéine : la cystéine à une concentration de $2.10^{-4}M$ inhibe la β hydroxylation de la tyramine à 80 p.100, alors qu'il suffit de $2.10^{-5}M$ groupes sulfhydryls apportés par des homogénats de médullosurrénale pour obtenir le même pourcentage d'inhibition (Nagatsu et al., 1967).

b) Inactivation et Localisation.

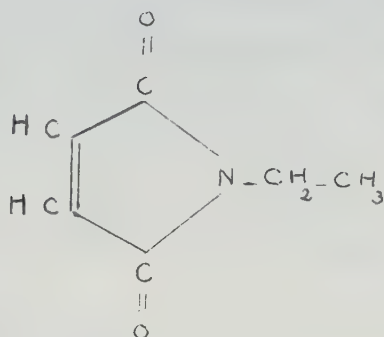
Les inhibiteurs endogènes peuvent être inactivés par un grand nombre de composés.

Additionnés à un homogénat total, les composés tels que Hg^{++} , Ag^+ , le p. hydroxymercuribenzoate et la N éthylmaleimide, augmentent l'activité dopamine β

oxydase alors que les cations tels Ca^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} et Ni^{+} n'ont aucun effet sur l'activité enzymatique (Duch et al., 1968).

Le cuivre Cu^{++} lève également l'inhibition, mais lorsque la concentration finale du cation est supérieure à $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$, la transformation enzymatique est inhibée de 60 à 80 p.100 (Goldstein et al., 1965). L'effet du cuivre dépend de la dilution de la préparation enzymatique : la même activité spécifique peut être obtenue avec une fraction enzymatique surnageante lorsque celle-ci est mise à incuber, soit non diluée en présence de Cu^{++} à une concentration finale de $10 \mu\text{M}$, soit diluée au 1/6 sans trace de cuivre (Duch et al., 1968).

La N éthylmaléimide



A une concentration finale de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$, la N éthylmaléimide augmente l'activité totale de la dopamine β oxydase contenue dans un homogénat de médullosurrénale de Boeuf (dans lequel on fait diffuser l'enzyme par traitement au Triton X 100). Par contre, l'addition de N éthylmaléimide à la seule fraction granulaire en présence de Triton X 100, ne modifie pas l'activité totale de l'enzyme.

Ce mode d'action de la N éthylmaléimide permet de conclure à la localisation cytoplasmique des inhibiteurs endogènes de la dopamine β oxydase (Belpaire et Laduron, 1970).

En plus de son effet inactivateur des inhibiteurs cytoplasmiques, la N éthylmaléimide semble agir également sur la membrane granulaire. En effet, l'addition de ce composé, à la seule fraction granulaire intacte (sans traitement au Triton X 100) augmente l'activité libre de la dopamine β oxydase. Cet effet est relié, selon les auteurs, à une action directe de la N éthylmaléimide sur la membrane granulaire modifiant la perméabilité membranaire et permettant ainsi une meilleure accessibilité du site enzymatique vis à vis du substrat.

VI - ACTIVITE ENZYMATIQUE -

Les valeurs de K_m varient peu selon les auteurs mais l'activité enzymatique est étroitement liée aux conditions expérimentales (Tableau VI).

VII - ETUDE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES D'INCUBATION -

1/ LE pH -

Le pH optimum de la réaction varie selon les modes de préparation de l'enzyme et selon le substrat utilisé.

Pour l'enzyme purifiée de la médullosurrénale de Boeuf, il se situe à pH 6,2 6,4 avec la dopamine comme substrat, alors qu'il varie entre 5 et 5,5 lorsque l'on utilise la tyramine. Pour l'enzyme non purifiée de la médullosurrénale de Lapin, le pH optimum est à 6 en présence de tyramine (Viveros et al., 1969a). L'enzyme particulaire de la médullosurrénale de Chat, étudiée sur les vésicules intactes, a un pH optimum de 7,5 alors que sur les vésicules lysées la même enzyme a un pH optimum de 5,5 (Duch et al., 1968).

2/ LES COFACTEURS -

a) Acide ascorbique.

L'acide ascorbique entre directement en jeu dans la réaction de β hydroxylation in vitro, car il réduit le groupement prothétique de l'enzyme Cu^{++} à l'état Cu^+ . D'autres agents réducteurs, tels que le NADPH, NADH, ne peuvent remplacer l'ascorbate même à une concentration deux à trois fois supérieure (Levin et Kaufman, 1961). Cependant, le rôle de l'ascorbate in vivo reste à définir car, chez les Cobayes scorbutiques, la quantité de noradrénaline synthétisée n'est pas diminuée par l'absence de l'acide ascorbique (Kirshner, 1966).

b) L'ATP.

Il accroît fortement l'hydroxylation de la dopamine lorsque l'on travaille avec l'enzyme particulaire et il peut être remplacé par le CTP ou le GTP. Il aurait un rôle énergétique permettant le passage de la dopamine à l'intérieur des granules (Kirshner, 1959b).

c) Catalase.

L'addition de catalase à une préparation d'enzyme purifiée de médullosurrénale de Boeuf permet de faire passer le rendement en noradrénaline, formée en 10 minutes, de

TABLEAU N° VI - ACTIVITE DE L'ENZYME DOPAMINE β OXYDASE DANS DIFFERENTS MILIEUX

PREPARATION ENZYMATIQUE	MILIEU D'INCUBATION EN μ MOLES	SUBSTRAT EN μ MOLES DUREE de l'INCUBATION	K_m	μ MOLES DE PRODUIT NEOFORME
Enzyme de Médullosurrénale Boeuf purifiée CREVELING et DALY, 1962	Tampon phosphate pH 5,5 100 Ascorbate 10 Fumarate 12 Catalase 200U Enzyme 20-40 μ g Volume final 1 ml	Tyramine 10 36° 10 à 30 mn	5,8 10^{-3} M	
Enzyme purifiée de Médullosurrénale de boeuf GOLDSTEIN et al., 1963	Tampon phosphate pH 6,4 100 Ascorbate 6 Fumarate 10 ATP 10 Enzyme 0,1ml Volume final 1 ml	Dopamine 2 37° 45 mn		1,8 μ moles/h.
Homogénat total de Médullosurrénale de boeuf 4,1 mg NAGATSU et al., 1967	Tampon phosphate de potassium pH 6,5 300 NEM 2,5 Harmaline 0,3 Fumarate 10 Ascorbate 10 Catalase 20ul solution saturée Volume final 1 ml	Tyramine 10 37° 50 mn		sans NEM 0,05/h/100 mg avec NEM 2,06/h/100 mg
Enzyme purifiée de Médullosurrénale de boeuf Tumeur humaine sympathique BOHUON et GUERINOT, 1968	Tampon phosphate de potassium pH 6,4 100 ATP 10 acide fumarique 10 acide ascorbique 6 enzyme 0,2 mg protéine volume final 1 ml	Dopamine 0,2 à 1 37° 10 mn	Enzyme bovin 3,12.10 ⁻³ M Enzyme neuroblastome 1,04.10 ⁻³ M	0,59.10 ⁻³ /mn/mg protéine 0,10.10 ⁻³ /mn/mg protéine
Homogénat total de Médullosurrénale de boeuf et de chat DUCH et al., 1968	Tampon phosphate de potassium (pH non indiqué) 100 ATP 5 Ascorbate 1 fumarate 10 transylcypromine 5 Cu ⁺⁺ 10.10 ⁻³ MgCl ₂ 5 Volume final 1 ml	Tyramine ¹⁴ C 0,005 37° 15 mn (boeuf) 30 mn (chat)		sans Cu ⁺⁺ 0,0036/h/100 mg avec Cu ⁺⁺ 0,065/h/100 mg
Granules de Médullosurrénale de Boeuf LADURON et BELPATRE, 1968	Tampon phosphate de potassium pH 5,5 100 acide ascorbique 10 acide fumarique 12 ATP 10 Transylcypromine 1 catalase 100U parfois Triton X 100 0,04% volume final 1 ml	Tyramine 10 25° 15 mn	1,6 10^{-3} M	sans Triton 0,53/h/100 mg avec Triton 8,4/h/100 mg
Médullosurrénale de Lapin (culot de centrifugation et surnageant) VIVEROS et al., 1969 ^a	Tampon phosphate de potassium pH 6 100 ascorbate 1 fumarate 10 ATP 5 transylcypromine 0,5 Cu ⁺⁺ 10.10 ⁻³ NEM 0,75 volume final 1 ml	Tyramine ¹⁴ C 0,01		0,68 mg/h
Sérum WEINSHILBOUM, 1971	Tampon Tris HCl pH 6 10 sérum 200ul fumarate 1,2 ascorbate 1,2 pargyline 0,16 catalase 200ug Cu ⁺⁺ 0,005 volume final 0,31ml	Tyramine 0,3 37° 20 mn	Homme 0,84.10 ⁻³ M Rat 0,7 10^{-3} M	Homme 0,35 /h/ml plasma Rat 0,006/h/ml plasma
Homogénat de Médullosurrénale de Lapin VIVEROS et al., 1969 ^b 1971 ^a 1971 ^b	Phosphate de potassium pH 6 100 fumarate 10 ascorbate 1 ATP 5 catalase 400U transylcypromine 0,5 phydroxymercure- benzoate Volume final 1 ml	Tyramine ¹⁴ C 0,01 37° 15 mn		0,0069/h/100 mg 0,0113/h/paire de glandes 0,0184/h/paire de glandes

0,03 à 0,25 μ mole. Selon Levin et Kaufman(1961), la catalase in vitro protégerait l'enzyme contre l'eau oxygénée pouvant se former au cours de l'oxydation de l'acide ascorbique.

d) L'oxygène.

La dépendance de la réaction enzymatique vis à vis de l'oxygène est totale. Pour la dopamine, le K_m de la réaction est de $6,1 \cdot 10^{-3} M$ dans un milieu contenant 100 p.100 d'oxygène, et de $1,8 \cdot 10^{-3}$ dans un milieu contenant 21 p.100 d'oxygène (air). Cependant, la vitesse maximale de la réaction (V_{max}) n'est pas modifiée. Si l'oxygène est remplacé par l'azote, l'hydroxylation de la dopamine est inhibée à 99 p.100 (Goldstein et al., 1968).

e) Fumarate.

Son rôle est resté longtemps inexpliqué. Les études cinétiques de Goldstein et al. (1968) ont montré que le fumarate modifie le rapport k_5/k_4 (voir chap. III § II) des constantes de vitesse de la réaction entre l'enzyme réduite et l'oxygène, ou l'enzyme réduite et le substrat. Par déplacement de l'équilibre, il favorise la formation du complexe enzyme réduite-oxygène. Le fumarate peut être remplacé par les acides dicarboxyliques ou l'acétate (Goldstein et al., 1968).

f) L'Acétate.

Il peut remplacer le fumarate mais il doit être présent à une concentration 20 fois supérieure pour obtenir la même stimulation de l'activité enzymatique (Goldstein et al., 1968).

g) Les Cations; les inactivateurs :

Cu^{++} , Hg^{++} , Ag^+ , le p. hydroxymercuribenzoate ou la N éthylmaléimide. Ces composés sont utilisés sur l'homogénat total pour inactiver les inhibiteurs endogènes contenus dans le milieu.

VIII - CONCLUSION -

La dopamine β oxydase (EC 1.14.2.1) est une oxydase à fonction mixte. Elle catalyse la transformation d'une mole de dopamine avec une mole d'oxygène et une mole d'ascorbate, en une mole de noradrénaline, une mole d'eau et une mole de déhydroxy-ascorbate. Le cuivre du groupement prosthétique, sous forme Cu^{++} , se réduit en Cu^+ et se réoxyde en Cu^{++} au cours de la réaction d'hydroxylation. Cette enzyme n'est pas

spécifique de la dopamine et hydroxyle le carbone β des phényléthylamines substituées ou non sur le cycle et la chaîne latérale. Les isostères des phényléthylamines (benzylhydrazines, O-benzylhydroxylamines) sont des inhibiteurs de l'activité enzymatique de type compétitif et la présence du cuivre au niveau du groupement prosthétique explique l'effet inhibiteur des agents de chélation, des composés sulfhydryls et du cuivre Cu^{++} ajouté en excès au milieu.

La dopamine β oxydase est présente dans les granules chromaffines contenant les catécholamines sous une forme fortement liée à la membrane et sous une forme soluble, facile à mobiliser et pouvant être libérée avec les catécholamines sous stimulation nerveuse. L'activité enzymatique de la fraction granulaire peut être augmentée soit par des procédés d'activation (Triton X 100) ayant pour but de libérer l'enzyme, soit par préincubation des granules intacts avec la N éthylmaléimide. L'enzyme est donc dans le granule sous une forme latente. En outre, la membrane du granule est considérée comme un facteur limitant l'accessibilité du site enzymatique vis à vis du substrat. Des inhibiteurs endogènes de l'enzyme sont présents dans le cytoplasme et leur inactivation par action du cuivre Cu^{++} ou de la N éthylmaléimide suggère que ces inhibiteurs peuvent être des composés sulfhydryls.

De toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'adrénaline, seule la dopamine β oxydase est intragranulaire et l'étape de transformation de la dopamine en noradrénaline peut être considérée comme un facteur limitant la biosynthèse de l'adrénaline in vivo (Laduron et Belpaire, 1968).

La signification in vivo des inhibiteurs endogènes de la dopamine β oxydase n'est pas connue.

2ÈME PARTIE

MATERIEL & METHODES

L'étude bibliographique nous a montré que la dopamine, présente dans la glande médullosurrénale des Vertébrés supérieurs ne constitue qu'une très faible partie de la concentration totale en catécholamines.

Ainsi nos résultats concernant la mise en évidence de la dopamine dans le tissu chromaffine de la Roussette dépendront des qualités de sensibilité et de spécificité de nos techniques.

L'étude du rôle précurseur de la dopamine vis à vis de la noradrénaline s'effectuera sur le tissu chromaffine in vitro en présence de substrat dopamine ^{14}C et les produits de réaction seront identifiés spécifiquement.

Il sera donc nécessaire de posséder une technique permettant d'isoler rigoureusement la dopamine des autres composés présents dans l'extrait tissulaire à l'état normal ou après une surcharge en dopamine ^{14}C .

Les principales techniques utilisées seront :

- une chromatographie spécifique sur résine des extraits tissulaires ou enzymatiques après incubation, devant séparer rigoureusement la dopamine des autres catécholamines et de la noradrénaline en particulier;
- un dosage fluorimétrique de la dopamine éluée, ou
- un comptage en scintillation liquide des fractions radioactives recueillies,
- une chromatographie sur papier des composés radioactifs révélés par autoradiographie.

Seules, les techniques d'étude classiques n'ayant pas nécessité de mise au point seront exposées dans cette partie. Les étapes d'extraction et de dosage de la dopamine ayant exigé une étude méthodologique personnelle seront développées au niveau des résultats expérimentaux (3ème Partie, Chapitre I).

CHAPITRE I

MATÉRIEL

I - LES ANIMAUX -

1/ LES POISSONS -

La Roussette sur laquelle nous travaillons est la Petite Roussette *Scyliorhinus canicula*. Son poids est environ de 200 g. Les animaux sont pêchés en Méditerranée⁽¹⁾ d'où ils sont acheminés par le train. Nous avons reçu deux lots différents de poissons :

- Roussettes vivantes, utilisées pour notre travail sur le contenu en dopamine dans le tissu chromaffine,
- Roussettes congelées dans l'azote liquide, utilisées pour notre travail sur les incubations enzymatiques.

Des nécessités, d'ordre purement matériel, expliquent la nature différente de ces animaux.

a) Les Roussettes vivantes. Elles sont endormies pour le transport. Dès leur arrivée, elles sont plongées dans un aquarium d'eau de mer oxygénée⁽²⁾ et ne sont pas utilisées, pour l'expérimentation, avant un délai de 3 jours. Puis elles sont légèrement endormies à la tricaïne méthane sulfonate (MS 222 Sandoz) à raison de 500 mg environ pour 20 l. d'eau de mer. Après 20 mn, un plastron est découpé sur la face ventrale et les viscères et organes de reproduction sont écartés; les éléments chromaffines apparaissent plaqués et réfringents. Ils sont groupés en une double série linéaire de corps suprarénaux (17 paires) qui s'étendent le long de l'axe aortique, depuis la région gastrique jusqu'à l'extrémité caudale. La paire la plus antérieure des corps suprarénaux, au voisinage des artères axillaires, forme les corps axillaires plus allongés et plus volumineux (une paire pèse environ 5 mg). Ils sont prélevés, gardés au congélateur si leur étude n'est pas immédiate puis

(1) Institut Michel PACHA, Laboratoire de Physiologie Maritime (83 - TAMARIS)
Directeur : Professeur G. PERES

(2) Laboratoire de Physiologie générale et comparée (Directeur : Prof. G. PERES)
U.E.R. de Biodynamique et de Psychophysiologie - Université Cl. BERNARD LYON I

découpés et mis en suspension dans HCl 0,1 M à raison de 0,2 ml/5 mg.

b) Les Roussettes congelées. Elles sont laissées 3 h. à température ambiante. Puis les corps axillaires sont prélevés dès la décongélation des animaux. Ils constitueront les extraits enzymatiques.

2/ LES RATS -

Ils sont utilisés pour la mise au point de la technique d'extraction. Ce sont des rats blancs de souche OFA de 150 à 200 g. Après une anesthésie à l'éther, les glandes surrénales prélevées par voie dorsale sont sectionnées pour libérer la partie médullaire. 15 mg de ce tissu chromaffine sont mis en suspension dans HCl 0,1 M (0,2 ml/5 mg). Le surnageant de centrifugation constituera le milieu salin protéique pour l'étude de l'extraction de la dopamine.

II - APPAREILS -

- Colonnes pour la chromatographie : colonnes en verre de 40 cm de hauteur, de diamètre intérieur variable (0,7 ou 0,9 cm), munies à leurs parties supérieures d'une boule de 150 ml et à leurs parties inférieures d'un fritté et d'un robinet.

- Spectrofluorimètre JOBIN-YVON "BEARN" à 2 monochromateurs,

- Compteur à scintillation liquide : NUCLEAR CHICAGO type 725 à 2 photomultiplicateurs

- Fioles de comptage en plastique

- Centrifugeuse : type SORVALL R.C. 2 B

III - RÉACTIFS -

Tous les réactifs sont R.P. pour analyses et préparés dans l'eau bidistillée.

A.T.P. : sel disodique, pentahydrate, A grade (Calbiochem)

Acide ascorbique (Calbiochem)

Acide éthylène diaminotétracétique (sel disodique) : EDTA à 10 p.100 dans l'eau

Acide fumarique (Calbiochem)

Acide trichloracétique : TCA à 3 p.100 dans l'eau

Amberlite CG 50 200 à 400 mesh préparée selon la méthode d'Hirs, Moore et Stein
Ascorbate acide (pour le dosage de la dopamine) : 2 mg d'acide ascorbique/ml
d'HCl 5 M (préparation extemporanée)

Ascorbate alcalin (pour le dosage de A et NA) : acide ascorbique 0,3 p.100 dans
l'eau (1 partie) NaOH 5 M (3 parties) préparation extemporanée

Catalase : de foie de Boeuf. 4500 unités/mg de protéine. 65 p.100 de protéine
B grade (Calbiochem)

Dopamine 2 ^{14}C :

Dopamine CEA : activité spécifique 58 mCi/mMole
50 μCi dans 5 ml d'HCl 0,01 M
0,058 ml = 10 nanomoles

Dopamine Amersham : activité spécifique 21,8 mCi/mMole
50 μCi dans 5 ml HCl 0,1 M
0,022 ml = 10 nanomoles

Après purification :

Dopamine CEA : 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ soit 0,58 $\mu\text{Ci}/0,29$ ml

Dopamine Amersham : 0,73 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ d'acétate d'ammonium acidifié soit
0,22 $\mu\text{Ci}/0,3$ ml

La dopamine ^{14}C est stockée à -20°C et décongelée extemporanément.

Etalons : Adrénaline (Sigma) = 5 mg, dihydroxyphénylsérine (Calbiochem) = 5 mg
DOPA (Fluka) = 5 mg, Dopamine (HCl) (Fluka) = 6,2 mg - Noradrénaline
(bitartrate) (Sigma) = 9,5 mg, 3-O méthyldopamine HCl (Sigma) = 6,2 mg

Les solutions mères à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sont obtenues en diluant ces pesées dans

HCl 0,01 M q.s.p. 50 ml. Elles sont gardées 1 mois à $+4^\circ\text{C}$.

Ferricyanure de potassium (pour le dosage de l'adrénaline et de la noradrénaline)
à 0,25 p.100 dans l'eau

Ferricyanure de potassium (pour la révélation des chromatogrammes) à 0,44 p.100
dans du phosphate dipotassique 0,1 M

Fixateur Kodak AL-4 : dilution au 1/5 dans l'eau

Iode 0,02 M : dans l'éthanol R.P. (conservation à l'obscurité à $+4^\circ\text{C}$ pendant
trois semaines)

Mélange scintillant : Triton X 100 (Touzart et Matignon) 1 partie
Herberg 2 parties

Herberg : P.P.O. 5 g
P.O.P.O.P. 0;1 g } toluène q.s.p. 1 l

P.P.O. = 2-5 diphényloxazolole (Calbiochem)

P.O.P.O.P. = 1,4-bis 2[(5phényloxazolyl)] benzène

N éthylmaléimide (Sigma) P.M. = 125,1

Papier (pour l'autoradiographie) Kodak régulix HS type 2

Papier (pour la chromatographie) Whatman n° 20 épaisseur 0,16 mm

Phosphate de sodium 0,5 M pH 6,5 : phosphate disodique 0,5 M, CH_3COOH 0,5 M
q.s.p. pH 6,5

Révélateur Kodak LX 24

Sulfite de sodium anhydre à 2,5 p.100 dans NaOH 4,5 M

Conservation à l'obscurité à $+4^\circ\text{C}$ pendant trois semaines.

CHAPITRE II

L'EXTRACTION ET LE DOSAGE DE LA DOPAMINE TISSULAIRE

I - L'EXTRACTION DE LA DOPAMINE -

Les techniques d'extraction tiennent compte de l'instabilité des catécholamines dans les solutions neutres ou alcalines.

1/ LES DIFFERENTES TECHNIQUES -

L'extraction de la dopamine tissulaire se fait par adsorption sur alumine ou par chromatographie sur résines échangeuses d'ions.

a) Adsorption sur alumine.

La dopamine est fixée à pH alcalin et éluée à pH acide. Cette méthode très utilisée pour l'étude des extraits biologiques (Anton et Sayre, 1964; Price et Price, 1957; Drujan et al., 1959) est une technique globale qui permet d'éliminer une grande partie des pigments et des protéines mais non de séparer la dopamine des autres catécholamines.

b) Chromatographie sur résines échangeuses d'ions cationiques.

Ce sont les supports les mieux adaptés pour l'extraction des catécholamines.

Ce sont :

- le Dowex 50 étudié par Bertler et al., 1958 et repris par Bertler et Rosengren (1959b), Laverty et Sharman (1965), Jonason (1968), Jonsson et Sachs (1970).
- l'Amberlite CG 120 étudiée par Haggendal (1962)
- l'Amberlite CG 50 utilisée par Kirshner et Goodall (1957) et reprise en particulier par Masuoka et al. (1963).

Le Dowex 50, l'Amberlite CG 120, l'Amberlite CG 50 permettent d'extraire et de séparer la dopamine tissulaire dans des conditions expérimentales très différentes selon les auteurs, résumées dans le tableau VII. Si, dans le détail, les diverses techniques présentent des inconvénients, les résines cationiques échangeuses d'ions peuvent, semble-t-il, s'adapter à une extraction spécifique désirée.

2/ CHOIX D'UNE TECHNIQUE -

Il apparaît qu'aucune technique ne pourra directement être retenue pour nos expériences. En effet, la méthode d'extraction de la dopamine doit répondre à plusieurs exigences :

- séparation rigoureuse de la dopamine des autres catécholamines
- et de la noradrénaline en particulier
- recherche d'un faible volume d'élution
- élution de la dopamine à un pH voisin de la neutralité pour son dosage ultérieur.

Nous avons choisi la technique proposée par Kirshner et Goodall. Son principe est une chromatographie par échange d'ions, dans laquelle l'Amberlite CG 50 (NH_4^+), en suspension dans de l'acétate d'ammonium 0,2 M pH 6,1 et l'extrait à chromatographier ont un pH identique; puis ce dernier est élué avec un tampon acétate d'ammonium 0,4 M pH 5 plus acide et plus molaire que celui de la résine.

Cette technique est intéressante car :

- l'élution est continue : l'utilisation du même agent d'élution permet de suivre l'extraction en tous points et obtenir ainsi la séparation des composés avec précision. Dans le cas contraire, l'emploi de plusieurs agents d'élution, donc un procédé discontinu, rend le contrôle de la séparation difficile.
- le pH d'élution à 5 est intéressant pour le dosage fluorimétrique ultérieur.
- la durée de l'expérience est acceptable.
- les remarques des auteurs laissent penser que la séparation de la noradrénaline et de la dopamine peut être améliorée.

Cependant, certains autres points de cette technique ne sont pas satisfaisants :

- les dimensions de la colonne (diamètre 0,9 cm; hauteur 30 cm) entraînent une forte dilution de la dopamine.
- le protocole d'extraction proposé pour la dopamine n'a été étudié que sur des solutions pures.

TABLEAU N° VII - LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION DE LA DOPAMINE

Résines	Conditions Expérimentales	Séparation	Observations	Auteurs
Amberlite CG 50 NH ₄ ⁺	Hauteur de la résine : 35 cm diamètre de la colonne: 0,9 cm adsorption : pH 6,1 élution : acétate d'ammonium 0,4 M pH 5	DOPA : de 15 à 30ml d'élution A : de 60 à 75ml " NA : de 75 à 90ml " OHT : de 90 à 110ml "	- volume d'élution élevé (15-20ml) - durée de l'expérience acceptable environ 26 h - bon rendement : 83 à 95% pour la dopamine - bonne séparation : aucune inter- férence possible avec la DOPA - pH d'élution faiblement acide - même agent d'élution : procédé continu	KIRSHNER & GOODA 1957
Dowex 50 Na ⁺ 200-400 mesh	résine : 1 g adsorption : pH 4 élution : HCl M puis HCl 2 M	NA : 0 à 6 ml (HCl M) OHT : 6 à 12ml (HCl 2M)	- volume d'élution peu élevé - durée de l'expérience très brève (4 h) - pas d'interférence avec la DOPA par le choix du Dowex - utilisation de deux agents d'élution : procédé discontinu - pH d'élution très acide	BERTLER, CARLSSON ROSENGREN, 1958
Dowex 50 Na ⁺ X 4	résine : 0,35 g adsorption : pH 4 élution : HCl 1,2 M	NA-A : 0 à 8 ml OHT : 8 à 18 ml		BERTLER & ROSENBERG 1959
Amberlite CG 120 H ⁺	hauteur de la résine : 105cm diamètre de la colonne: 0,19cm élution : HCl M	NA A NMN MN OHT = 4 ml	- position de la DOPA inconnue - durée expérimentale longue : 90 h. - élution très acide - fluorescence de la résine	HAGGENDAL, 1962

TABLEAU N° VIII - LES DIFFERENTS DOSAGES FLUORIMETRIQUES DE LA DOPAMINE (réaction aux dihydroxyindoles)

AUTEURS	Milieu d'oxydation	Oxydant	Arrêt de l'oxydation	Acidification	Longueurs d'Onde	Sensibilité
CARLSSON, WALDECK 1958	Phosphate 0,1 M pH 6,5	I ₂ 0,02 M dans l'eau 0,05 ml 5 mn	Sulfite alcalin 2,5% 0,5 ml 5 mn	CH ₃ COOH pur 0,6 ml	345-410 mμ	0,05 μg/ml
ANTON et SAYRE 1962 (urine)	non précisé	K ₃ Fe (CN) ₆ 0,25 % 0,02 ml 1 mn	Ascorbate alcalin 0,2 ml	non précisée	non précisée	non précisée
Mc GEER, Mc GEER 1962 (tissu nerveux)	Acétate de Sodium M pH 6	I ₂ 0,01 M dans l'eau 0,125 ml 10 mn	Sulfite de Sodium 2,5% 0,125 ml 3 mn	HCl 5 M : 0,25 ml 133 mn	330-380 mμ	non précisée
ANTON et SAYRE 1964 (tissus)	Phosphate 0,5 M pH 7	Périodate de Sodium 0,5% 0,02 ml 1 mn	Sulfite alcalin 2,5% 0,1 ml	HCl 5 M : 0,02 ml 3 mn	333-390 mμ	0,05 μg/ml
FLEMING et al. 1965 (tissu nerveux)	Acétate de Sodium M pH 5,2	I ₂ 0,02 M dans l'éthanol : 0,2 ml 3 mn	Sulfite alcalin 2,5% 0,2 ml 3 mn	HCl 5 M Acide ascorbique (0,4 ml) 45 mn	330-385 mμ	non précisée
LAVERITY, TAYLOR 1968	Phosphate M/15 pH 7	I ₂ 0,02 M dans NaI à 5% 0,05 ml	Sulfite alcalin 2,5% 0,25 ml	CF ₃ COOH pur 0,1 ml à 100° 40 mn	320-375 mμ	4 ng

Ainsi, nous avons étudié certaines caractéristiques de cette technique afin de :

- réduire le volume de tampon nécessaire à l'élution de la dopamine,
- séparer rigoureusement la dopamine des autres catécholamines, même en milieu salin protéique,

en étudiant les paramètres suivants :

- hauteur de la résine
- diamètre de la colonne
- volume de la résine
- pH d'adsorption et d'élution de l'extrait

La mise au point de cette technique d'extraction sera développée dans la 3ème Partie chapitre I.

- LE DOSAGE DE LA DOPAMINE -

Les techniques colorimétriques de condensation à l'éthylène diamine (Natelson et al., 1949; Harley et al., 1958) ou d'oxydation à l'iode (Euler et al., 1951) sont aujourd'hui abandonnées et remplacées par les techniques fluorimétriques beaucoup plus sensibles.

1/ LES DIFFERENTES TECHNIQUES FLUORIMETRIQUES -

Deux types de réaction caractérisent ces techniques fluorimétriques :

a) Condensation avec l'éthylène diamine.

Le groupement catéchol de la molécule se condense avec l'éthylène diamine pour former un dérivé très fluorescent (Weil-Malherbe et Bone, 1957) (Kagi et al., 1957). La très bonne sensibilité de la réaction a permis le dosage de la dopamine tissulaire dans le nerf splénique (Euler et Lishajko, 1957) et le tissu nerveux (Laverty et Sharman, 1965 Gerardy et al., 1971), mais cette réaction présente l'inconvénient de manquer de spécificité (Valk et al., 1956) (interférence en particulier de l'adrénaline et de la noradrénaline).

b) Formation d'un trihydroxyindole.

L'oxydation de la molécule en quinone, suivie d'une cyclisation en aminochrome et d'un réarrangement intramoléculaire conduisent à la formation du dérivé 5-6 dihydroxyindole de la dopamine, fluorescent : c'est la méthode aux trihydroxyindoles (T.H.I.) (Carlsson et Waldeck, 1958).

Le composé fluorescent est obtenu en trois étapes :

- oxydation de la dopamine avec le ferricyanure de potassium, le périodate de sodium ou l'iode, ce dernier étant l'oxydant le plus utilisé;
- arrêt de l'oxydation par addition de sulfite alcalin destiné à éliminer l'excès d'oxydant;
- stabilisation du composé fluorescent formé par acidification du milieu avec un acide, seul ou en présence d'acide ascorbique destiné à absorber l'oxygène du milieu.

La plupart des auteurs ont utilisé le principe de cette technique pour doser la dopamine urinaire (Mattock et al., 1966) ou tissulaire (Mc Geer et Mc Geer, 1962; Fleming et al., 1965; Bertler et Rosengren, 1959c). Les différentes conditions expérimentales sont résumées dans le tableau VIII.

2/ CHOIX D'UNE METHODE DE DOSAGE -

Nous avons retenu la méthode fluorimétrique aux trihydroxyindoles proposée par Fleming et al. (1965) et reprise par Pujol (1967).

Le pH d'oxydation de la dopamine est fixé à 5,2 et il sera donc proche du pH d'élution extrayant la dopamine de l'amberlite. De plus, la formation du fluorophore à température ambiante rend cette technique facile à utiliser.

Cependant, nous n'avons pas pu appliquer directement la technique proposée par les auteurs à nos dosages biologiques avant d'étudier les caractéristiques optimales de la réaction de fluorescence et ses limites d'utilisation lorsque la dopamine est contenue dans un tampon acétate d'ammonium 0,4 M, tampon éluant l'amine de la résine.

L'étude des différents paramètres affectant la réaction de fluorescence de la dopamine sera développée dans la partie Résultats (3ème Partie - chapitre I).

CHAPITRE III

LES INCUBATIONS ENZYMATIQUES

Le tissu chromaffine de la Roussette est mis à incuber in vitro en présence de substrat dopamine ^{14}C et de cofacteurs. Le produit radioactif néoformé est séparé du substrat ^{14}C puis identifié. La chronologie des étapes techniques est la suivante :

- incubation du tissu contenant l'enzyme en présence de dopamine ^{14}C et des cofacteurs,
- chromatographie du milieu d'incubation sur amberlite CG 50 devant séparer la dopamine ^{14}C du produit de la réaction enzymatique et comptage radioactif des fractions éluées,
- identification du produit ^{14}C par fluorescence et par chromatographie sur papier (autoradiographie).

I - LES MILIEUX D'INCUBATION -

Les constituants de base des milieux d'incubation, le volume final et la durée d'incubation sont les mêmes pour toutes nos expériences. Cependant, l'étude des différents facteurs de l'activité dopamine β oxydase nous a conduits à modifier partiellement certains milieux et le détail précis de chaque paramètre expérimental figurera dans la 3ème Partie, chapitre III.

1/ LES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA REACTION ENZYMATIQUE -

Chaque milieu d'incubation comprend :

- la préparation enzymatique
- le substrat : dopamine ^{14}C
- les cofacteurs

sous un volume final de 1 ml.

a) La préparation enzymatique.

Nous travaillons avec le tissu chromaffine dans son ensemble, sans essai de purification ou d'isolement de l'enzyme. Après décongélation des Roussettes, les corps axillaires sont prélevés avec une pince en inox et pesés. Puis, ils sont finement découpés et réduits en une suspension homogène dans un milieu approprié.

Ces extraits tissulaires sont utilisés immédiatement mais peuvent cependant être gardés à +4°C une demi-heure au maximum.

b) Le substrat.

Le substrat de la réaction enzymatique est la dopamine 2 ^{14}C dissoute

- soit dans HCl 0,01 M (activité spécifique 58 mCi/mMole avec 10 $\mu\text{Ci/ml}$ d'HCl 0,01 M)
- soit dans de l'acétate d'ammonium acidifié (activité spécifique 21,8 mCi/mMole avec 0,73 $\mu\text{Ci/ml}$).

La dopamine est contenue dans deux milieux différents car nous avons dû la purifier, dans la plupart des cas, avant de l'utiliser pour nos expériences d'incubation. Le problème posé par le substrat sera développé dans la 3ème Partie, chapitre III.

La concentration finale en substrat dans le milieu d'incubation (1 ml) est de 10 nanomoles.

c) Les cofacteurs.

Le milieu d'incubation (1 ml) comprend, pour toutes les expériences, les cofacteurs suivants :

- acide ascorbique : 6 μmoles
- acide fumarique : 10 μmoles
- A.T.P : 10 μmoles

Les cofacteurs sont pesés avant chaque expérience et dilués avec le substrat dans le milieu choisi.

2/ LE VOLUME FINAL DE L'INCUBATION -

Il est de 1 ml pour toutes les expériences. Il est obtenu par addition du milieu comprenant les cofacteurs et le substrat (0,8 ml) et de l'homogénat apportant la préparation enzymatique (0,2 ml).

3/ CONCENTRATION SALINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION -

La molarité des sels utilisés, phosphate de potassium ou acétate d'ammonium, est calculée afin d'obtenir dans 1 ml de milieu final d'incubation le nombre de moles d'anions désiré : 100 ou 200 μ moles.

4/ SCHEMA DE PREPARATION DES MILIEUX D'INCUBATION -

a) Expériences effectuées avec le substrat non purifié.

Substrat et Cofacteurs : 0,8 ml	+	Préparation enzymatique : 0,2 ml
. Dopamine ^{14}C $\left\{ \begin{array}{l} 0,058 \text{ ml d'HC1 } 0,01 \text{ M} \\ 0,58 \text{ } \mu\text{Ci} \\ 10 \text{ nanomoles} \end{array} \right.$. Cofacteurs . Phosphate dipotassique $0,2 \text{ M} = 0,4 \text{ ml}$ $= 80 \text{ } \mu\text{moles de phosphate}$. pH = ajusté à la valeur étudiée avec $\text{Na OH } 0,5 \text{ M}$. eau = q.s.p. $0,8 \text{ ml}$		tampon monopotassique dipotassique $0,1 \text{ M au pH étudié :}$ $0,2 \text{ ml} = 20 \text{ } \mu\text{moles de phosphate}$

1 ml du milieu d'incubation contient donc 100 μ moles de phosphate

b) Expériences effectuées avec le substrat purifié.

1er CAS : PREPARATION ENZYMATIQUE DANS LE TAMPON ACETATE D'AMMONIUM 0,46 M

Substrat et Cofacteurs : 0,8 ml	+	Préparation enzymatique : 0,2 ml
. Dopamine ^{14}C $\left\{ \begin{array}{l} 0,3 \text{ ml d'acétate } 0,4\text{M} \\ \text{acidfié} \\ 108 \text{ } \mu\text{moles d'acétate} \\ 10 \text{ nanomoles} \end{array} \right.$. cofacteurs . pH = ajusté à la valeur étudiée avec $\text{Na OH } 0,5 \text{ M}$. eau = q.s.p. $0,8 \text{ ml}$		acétate d'ammonium $0,46 \text{ M au pH}$ étudié = $0,2 \text{ ml} = 92 \text{ } \mu\text{moles}$ d'acétate

1 ml du milieu d'incubation contient 200 μ moles d'acétate

2ème CAS / EXPERIENCES EFFECTUEES AVEC LA N ETHYLMALÉIMIDE EN PREINCUBATION

Dans certaines expériences, la préparation enzymatique doit être préincubée avec la N éthylmaléimide et l'ATP.

Le schéma de préparation du milieu d'incubation est alors modifié car la N éthylmaléimide et l'ATP sont ajoutés directement à l'extrait enzymatique en vue d'une préincubation.

Préparation enzymatique = 0,2 ml

Acétate d'ammonium 0,46 M

au pH étudié = 0,2 ml = 92 μ moles d'acétate

N éthylmaléimide = 4 ou 10 μ moles

ATP = 10 μ moles

Préincubation 10 mn à 30° sous agitation à l'air

Substrat et Cofacteurs = 0,8 ml

. Dopamine ^{14}C $\left\{ \begin{array}{l} 0,3 \text{ ml d'acétate } 0,4 \text{ M acidifié} \\ 108 \text{ } \mu\text{moles d'acétate} \\ 10 \text{ nanomoles de substrat} \end{array} \right.$

. Cofacteurs

. pH = ajusté à la valeur étudiée avec NaOH 0,5 M

. eau = q.s.p. 0,8 ml

Les 0,8 ml contenant le substrat et les autres cofacteurs sont ajoutés aux 0,2 ml de la préparation enzymatique dès la fin des 10 mn de préincubation, c'est-à-dire au temps $t_{10} + t_0$.

c) Préparation du blanc d'incubation.

Toutes les expériences comprennent un blanc d'incubation conduit dans des conditions expérimentales identiques à celles des incubations en présence de la dopamine β oxydase.

Le blanc est constitué de corps axillaires finement découpés, portés à ébullition pendant 10 mn et additionnés de 0,05 ml de TCA à 6 p.100. A ce tissu sont ajoutés :

- 0,2 ml de tampon acétate d'ammonium 0,46 M
- et - 0,8 ml de solution saline apportant le substrat et les cofacteurs.

5/ DUREE DE L'INCUBATION -

Les incubations se font, dans tous les cas, à 30° pendant 20 mn, sous agitation constante à l'air.

Puis, un entraîneur stable (10 μ g de noradrénaline et 10 μ g de dopamine) est ajouté au milieu avant d'arrêter la réaction enzymatique par addition de 0,5 ml de TCA 3 p.100.

II - SÉPARATION DU SUBSTRAT ^{14}C ET DU PRODUIT ^{14}C NÉOFORMÉ -

1/ EXTRACTION DU CONTENU DE L'INCUBATION ENZYMATIQUE -

Le milieu d'incubation, additionné d'entraîneurs (noradrénaline et dopamine) et acidifié par le TCA est centrifugé pendant 20 mn au froid à 19 000 t/mn en présence de 0,5 ml d'EDTA à 10 p.100 et de 0,5 ml d'acide ascorbique à 0,3 p.100.

Le surnageant est repris pour être extrait sur Amberlite CG 50 dans les conditions expérimentales précisées ultérieurement dans la 3ème Partie chapitre I. L'extraction s'effectue au froid, pour éviter une dégradation de la dopamine ^{14}C .

Après avoir recueilli un volume mort de 60 ml, l'élution s'effectue par fractions successives de 3 ml.

2/ COMPTAGE RADIOACTIF DES FRACTIONS ELUEES -

La technique utilisée pour la détermination quantitative de la radioactivité est la scintillation liquide.

a) Principe.

. Les différents constituants -

Le radioisotope est mélangé avec un solvant contenant une, ou plusieurs, substances fluorescentes. La fiole de comptage comprend :

- l'émetteur $\beta^{-14}\text{C}$
- le solvant : le toluène
- le scintillateur primaire : P.P.O.
- le scintillateur secondaire : P.O.P.O.P.

L'énergie β^{-} émise par le carbone ^{14}C excite les molécules de solvant. Elles cèdent ensuite une partie de leur énergie aux molécules des scintillateurs primaire et secondaire qui émettent des scintillations décelées par la photocathode d'un photo-multiplicateur.

. Le bruit de fond -

Les impulsions parasites (rayonnement cosmique, effet thermique) constituent un bruit de fond. En pratique, le rapport $\frac{\text{cpm de l'échantillon}}{\text{cpm du bruit de fond}}$ doit être maximum.

Le bruit de fond peut être diminué en effectuant les comptages dans une bande énergétique peu étendue entre une tension de référence inférieure T R I et une tension de référence supérieure T R S.

. L'extinction -

La présence d'impuretés dans la fiole de comptage diminue le rendement de comptage et le rapport $\frac{\text{activité mesurée}}{\text{activité théorique}}$ est toujours inférieur à 100 p.100 : c'est le phénomène d'extinction ou *quenching*.

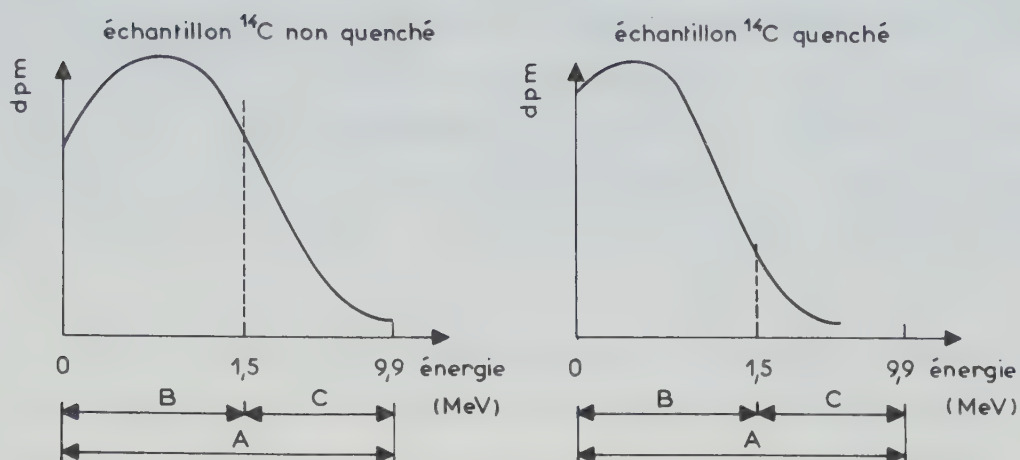
Ainsi, le nombre d'impulsions de faible énergie augmente d'autant plus que le milieu est plus impur et, pour l'interprétation des résultats, il est très important de déceler l'amplitude du quenching.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour connaître le rendement de comptage :

- méthode de l'étalonnage interne
- méthode de l'étalonnage externe
- méthode du rapport des canaux

Nous avons utilisé la méthode du rapport des canaux dans laquelle l'extinction

se traduit à la fois par une baisse globale du rendement de comptage et par un déplacement du spectre énergétique vers les faibles énergies.



L'appareil à scintillation liquide Nuclear Chicago offre la possibilité de mesurer la radioactivité simultanément dans trois bandes énergétiques (canaux). Ainsi, le comptage d'un même échantillon est réalisé dans un canal A, recouvrant la totalité du spectre et dans deux canaux B et C définis arbitrairement pour partager le spectre global en deux parties.

Lorsque le quenching croît, le rendement global de comptage, calculé dans le canal A, diminue et le rapport $\frac{B}{C}$ augmente.

La courbe du rendement en fonction du rapport B/C (obtenue sur des échantillons ^{14}C d'activité connue) permet d'évaluer le rendement de comptage d'un prélèvement ^{14}C dont on a mesuré le rapport B/C et de corriger ainsi l'activité de ce prélèvement lue dans le canal A.

b) Conduite des essais.

Les éluats radioactifs aqueux des colonnes d'Amberlite sont dispersés dans le solvant toluène, au moyen du Triton X 100.

Chaque fiole de comptage comprend :

- 0,5 ml d'éluat radioactif
- 10 ml de mélange Triton - Herberg

L'agitation de ce mélange fournit une suspension homogène que l'on refroidit (au minimum 16 h.) avant le comptage. La durée du comptage est de :

- 10 mn pour les fraction dopamine ^{14}C
- 20 mn pour les fractions de noradrénaline ^{14}C

Les tensions et les canaux sont réglés ainsi :

T R I = Data = 925 v

T R S = Gate = 1150 v

canal A = $L_1 - L_2 = 0 - 9,9$ v

canal B = $L_3 - L_4 = 0 - 1,5$ v

canal C = $L_4 - L_5 = 1,5 - 9,9$ v

Le rapport $\frac{\text{cpm dans le canal B}}{\text{cpm dans le canal C}}$ permet, en se rapportant à la courbe d'étalonnage, de connaître le rendement de comptage. Il varie entre 75 et 90 p.100.

L'activité totale en coups/mn (cpm) mesurée dans le canal A est transformée en désintégrations/mn (dpm) par correction du rendement de comptage à 100 p.100.

III - IDENTIFICATION DU PRODUIT DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE NÉOFORMÉ -

Le produit ^{14}C néoformé est identifié :

- par sa position exacte dans le diagramme de fractionnement obtenu au cours de son élution sur l'Amberlite (comparaison avec la noradrénaline stable ajoutée)
- par une chromatographie sur papier du milieu après incubation suivie d'une autoradiographie.

1/ POSITION DU COMPOSE ^{14}C DANS LE DIAGRAMME DE FRACTIONNEMENT -

La noradrénaline stable, ajoutée au milieu d'incubation comme entraîneur, est extraite sur Amberlite CG 50 avec le produit ^{14}C de la réaction enzymatique. Elle est dosée, par fluorimétrie, dans les éluats correspondants.

La superposition du diagramme de fractionnement de la noradrénaline stable et du composé radioactif élué constitue l'un des facteurs permettant d'identifier le produit ^{14}C néoformé.

2/ CHROMATOGRAPHIE ET AUTORADIOGRAPHIE -

Les composés radioactifs, contenus dans la totalité du milieu après incubation, migrent sur un papier à chromatographie dans un solvant approprié, puis sont révélés par autoradiographie.

a) La migration sur papier.

Avant l'extraction du milieu sur résine, 100 µl de chaque surnageant d'incubation sont prélevés et déposés sur un papier Whatman n° 20. Puis, par chromatographie descendante, ils migrent pendant 15 h. dans le solvant butanol-acide acétique-eau (8.1.1).

Les solutions étalons de dopamine et de noradrénaline stables (20 µl de solution à 1 mg/ml dans HCl 0,01 M) migrent dans les mêmes conditions, puis sont révélées, après séchage du chromatogramme pendant 2 h. à l'air ambiant, avec du ferricyanure dipotassique 0,1 M 0,44 p.100 pH 7,4.

Les spots violets ont un R_f de 0,42 pour la dopamine et
de 0,11 pour la noradrénaline.

Les composés radioactifs sont révélés par autoradiographie.

b) l'Autoradiographie.

C'est la révélation des taches radioactives. Le composé radioactif impressionne une émulsion photographique, l'image est ensuite révélée puis fixée.

Le radiochromatogramme est mis en contact avec un film KODAK-Régulix, HS type 2 et l'ensemble est enfermé dans une cassette métallique pendant une durée variable selon l'activité du composé radioactif (3 à 4 mois).

Puis le film est révélé dans un révélateur KODAX LX-24 pendant 3 mn, lavé à l'eau courante, fixé dans un bain KODAK AL-4 pendant 30 mn et lavé à l'eau courante pendant 2 h. Il est ensuite séché à l'air ambiant.

3ÈME PARTIE

RESULTATS

Ils comprennent :

- La mise au point d'une technique d'extraction et de dosage de la dopamine devant assurer, pour cette amine, une spécificité et une sensibilité maximales.

L'application de cette technique permettra d'étudier :

- Le contenu en dopamine du tissu chromaffine de la Roussette,
- L'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline dans ce tissu.

CHAPITRE I

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DE LA DOPAMINE

I L'EXTRACTION DE LA DOPAMINE -

La technique d'extraction doit permettre d'isoler la dopamine des catécholamines présentes dans le tissu chromaffine de la Roussette et de la séparer de la noradrénaline ^{14}C formée au cours de la réaction enzymatique après incubation du tissu avec la dopamine ^{14}C .

Selon les critères décrits dans la 2ème Partie, chapitre II, nous avons choisi la technique d'extraction sur Amberlite CG 50 (NH_4^+) proposée par Kirshner et Goodall (1957); nous avons dû en modifier certaines caractéristiques afin de réduire le volume de tampon nécessaire à l'élution de la dopamine et de séparer rigoureusement la dopamine des autres catécholamines, même en milieu salin protéique.

Nous avons ainsi étudié les paramètres suivants :

- hauteur de la résine
- diamètre de la colonne
- volume de la résine
- pH d'adsorption et d'élution de l'extrait

I/ MODE OPERATOIRE GENERAL -

- Les colonnes : décrites dans la 2ème Partie, chapitre I
- La résine : Amberlite CG 50 (NH_4^+) préparée selon la méthode d'Hirs et al. (1953) en suspension dans de l'acétate d'ammonium 0,2 M à un pH déterminé pour chaque essai.
- Préparation des extraits : Les extraits déposés sur la résine contiennent :
 - pour l'étude de l'extraction en milieu pur :
 - . 0.1 ml de solution d'adrénaline et de noradrénaline à 100 $\mu\text{g/ml}$ dans HCl 0,01 M
 - . 0.1 ml de solution de dopamine à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans l'eau
 - . 0.5 ml d'acide ascorbique 0.3 p.100 (antioxydant)
 - . 0.5 ml d'EDTA 10 p.100 (agent chélateur des métaux lourds)

- pour l'étude de l'extraction en milieu salin protéique

- . 0.1 ml de solution d'adrénaline et de noradrénaline à 100 µg/ml dans HCl 0,01 M
- . 0.1 ml de solution de dopamine à 10 µg/ml dans l'eau ajoutés au surnageant chlorhydrique 0.1 M de 15 mg d'homogénat de médullosurrénale de Rat
- . 0.5 ml d'acide ascorbique 0,3 p.100
- . 0,5 ml d'EDTA 10 p.100

Le pH de ces extraits est ajusté rigoureusement au pH de la résine avec quelques gouttes d'ammoniaque M puis 0,2 M et l'addition d'acétate d'ammonium 0,2 M au même pH permet de déposer un volume constant sur la résine entre 2,5 et 3 ml.

- L'élution : l'éluant est l'acétate d'ammonium 0,4 M dont le pH est déterminé pour chaque essai. Il est déposé sur la colonne dès la disparition de l'extrait. L'élution se fait à la pression atmosphérique, sans dispositif particulier. Les fractions recueillies sont de 2,3; 3; 4 ou 5 ml.

2/ ETUDE DE L'EXTRACTION DE LA DOPAMINE EN MELANGE AVEC LA NORADRENALINE ET L'ADRENALINE CONTENUES DANS UN MILIEU PUR -

Les étapes de cette étude sont représentées dans le tableau ci-dessous. Elles portent sur des variations du diamètre et de la hauteur de la résine et des variations des pH d'adsorption et d'élution.

TABEAU IX - LES PARAMÈTRES MODIFIANT L'EXTRACTION DE LA DOPAMINE CONTENUE DANS UN MILIEU PUR

Diamètre de la colonne (cm)	0.9	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Hauteur de la résine (cm)	35	18	30	30	30	30	30	30
Volume de la résine (cm ³)	22.2	6.9	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5
pH d'adsorption	6.1	6.1	6.1	6	5.5	6	5.5	5.8
pH d'élution	5	5	5	5	5	4.5	4.5	5
Volume de tampon éluant la dopamine (ml)	20	15	20	20	16	15	8	12
Rendement d'extraction de la dopamine (%)	85	86	105	99	98	64	50	96
Figures	-	1	2	3	4	5	6	7

Les différents diagrammes (fig. 1 à 7) font apparaitre les principales conclusions suivantes :

a) Effets de la variation du volume d'Amberlite. (fig. 1, 2)

- une diminution du diamètre de la colonne et de la hauteur de la résine (par rapport aux conditions des auteurs) diminue le volume de tampon éluant la dopamine mais rend impossible la séparation de cette amine du bloc adrénaline-noradrénaline (fig. 1)

- une augmentation de la hauteur de la résine (30 cm) en maintenant le diamètre de la colonne à 0,7 cm semble améliorer la séparation de la dopamine mais le volume d'élution devient trop élevé (20 ml). Un essai de séparation par augmentation de la hauteur de l'Amberlite ne se justifie pas (fig. 2). Le pH d'adsorption à 6,1 et le pH d'élution à 5 semblent mieux adaptés à la séparation de la noradrénaline et de l'adrénaline entre elles qu'à celle de la noradrénaline et de la dopamine.

b) Effets de la variation du pH de la résine (fig. 2, 3, 4).

- en maintenant constants le diamètre de la colonne (0,7 cm), la hauteur de la résine (30 cm) et le pH d'élution (5), la diminution du pH de la résine (6,1; 6 et 5,5) avance la fraction de la noradrénaline dans celle de l'adrénaline, alors que celle de la dopamine semble moins déplacée. Il est donc possible de séparer la dopamine en diminuant le pH de la résine, dans de faibles limites cependant puisque à pH 5,5 la séparation devient moins satisfaisante.

c) Effets de la variation du pH d'élution. (fig. 3 et 5; 4 et 6)

Lorsque l'extrait est adsorbé à pH 6 la diminution du pH d'élution (5 et 4,5) avance nettement le diagramme de la dopamine (fig. 3 et 5).

Lorsque l'extrait est adsorbé à pH 5,5 la diminution du pH d'élution (5 et 4,5) semble affecter surtout le recouvrement des fractions noradrénaline et adrénaline (fig. 4 et 6). Le volume de tampon nécessaire à l'élution de la dopamine est très réduit lorsque le pH de la résine est à 5,5 et celui de l'éluant à 4,5 mais la séparation de cette amine est impossible.

Il est donc impossible de concilier les deux facteurs : faible volume de tampon éluant la dopamine et séparation de cette amine du bloc adrénaline-noradrénaline.

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la Noradrénaline (10 μg) en milieu pur.

Effets de la variation du volume d'Amberlite (fig. 1, 2)

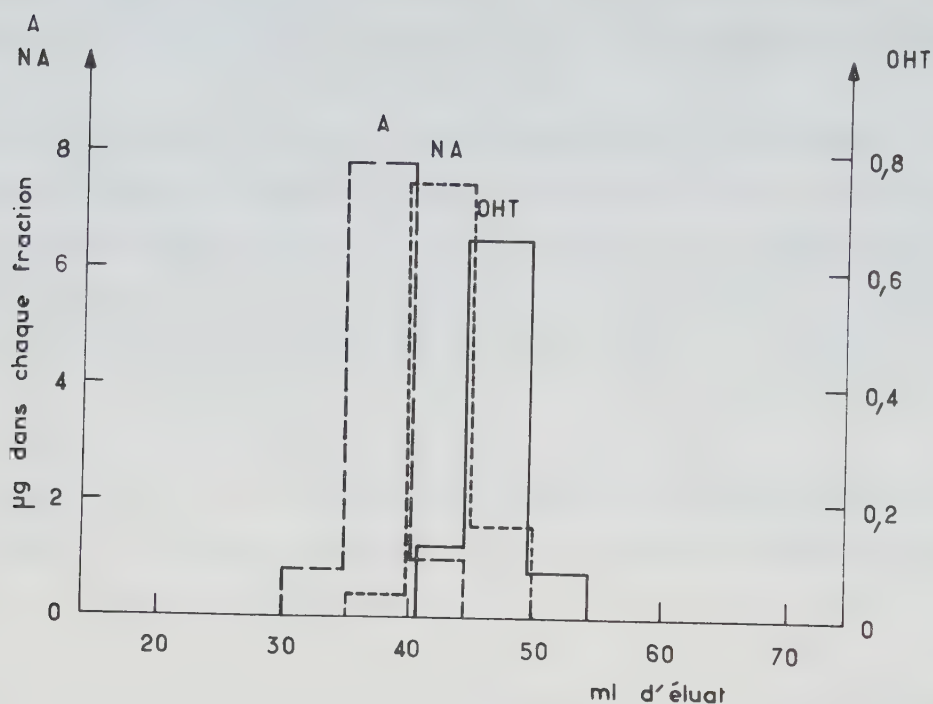


Fig. 1 - $h = 18 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 6,9 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 6,1 ; pH d'élution 5

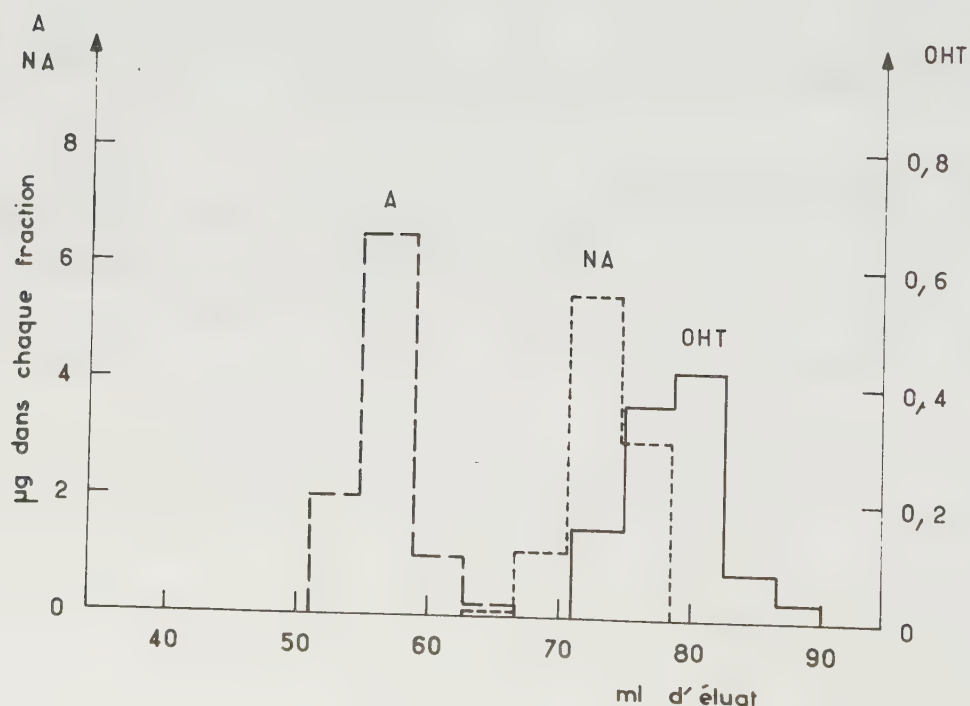


Fig. 2 - $h = 30 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 6,1 ; pH d'élution 5

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la Noradrénaline (10 μg) en milieu pur.

Effets de la variation du $\bar{pH}$ de la résine (Fig. 2, 3, 4)

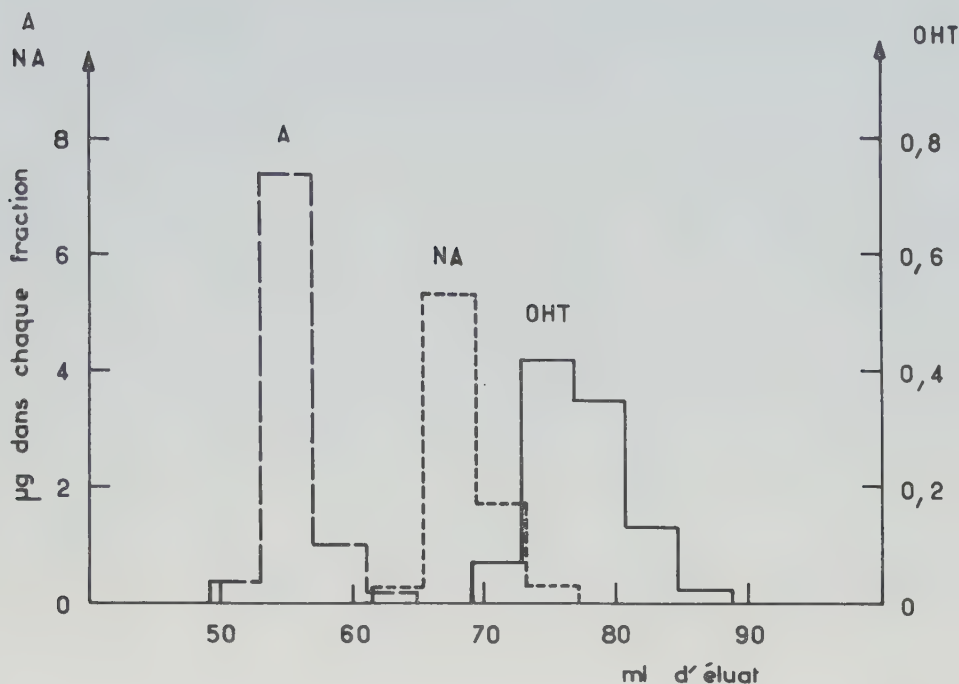


Fig. 3 - $h = 30 \text{ cm}$; $\Phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 6 ; pH d'élution 5

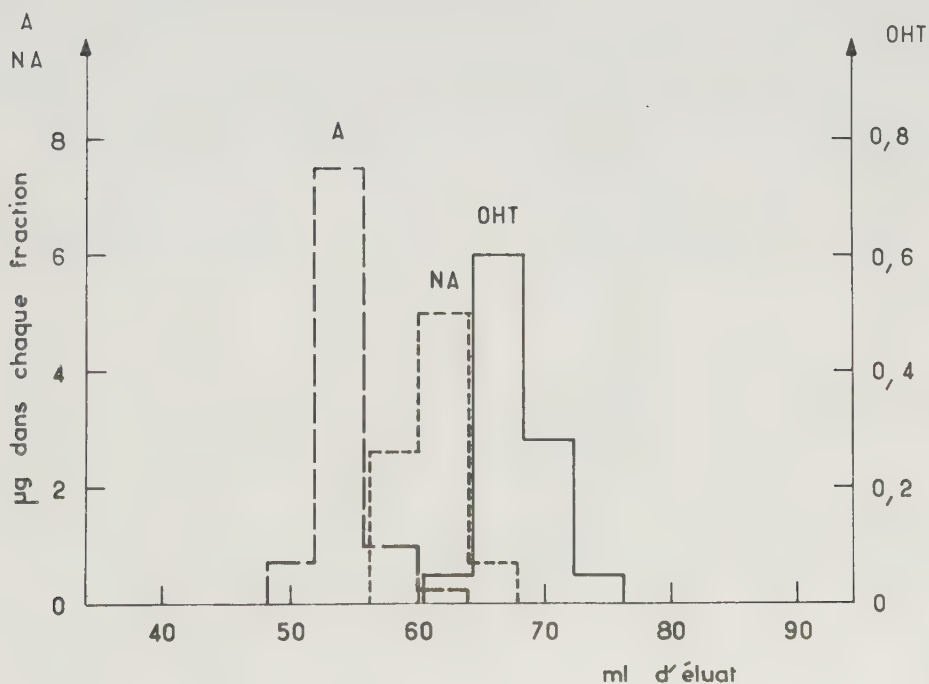


Fig. 4 - $h = 30 \text{ cm}$; $\Phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,5 ; pH d'élution 5

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la noradrénaline (10 μg) en milieu pur.

Effets de la variation du pH d'élution (fig. 3 et 5; 4 et 6)

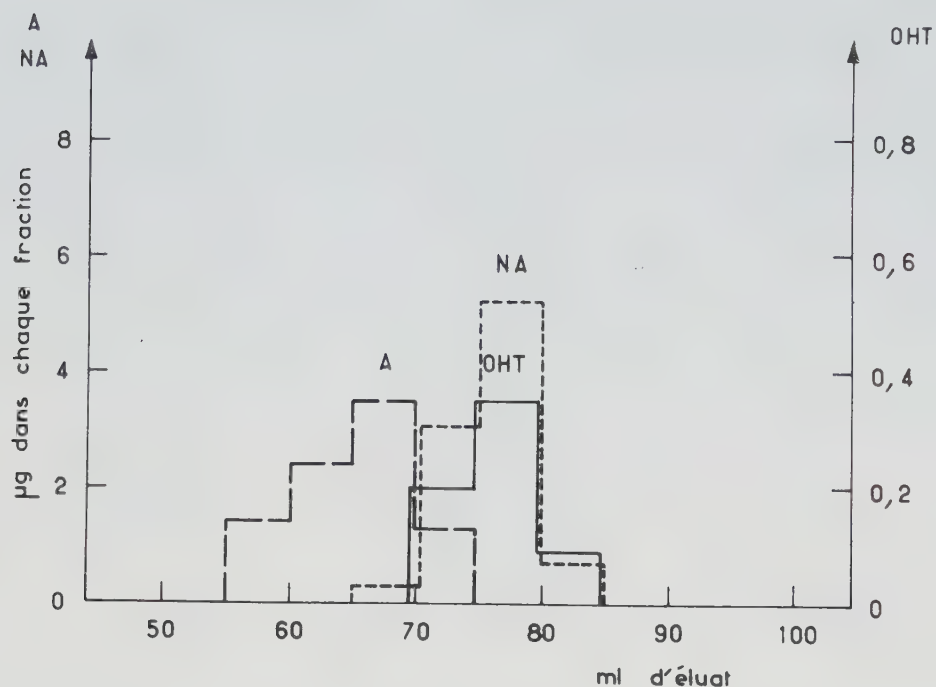


Fig. 5 - $h = 30 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 6 ; pH d'élution 4,5

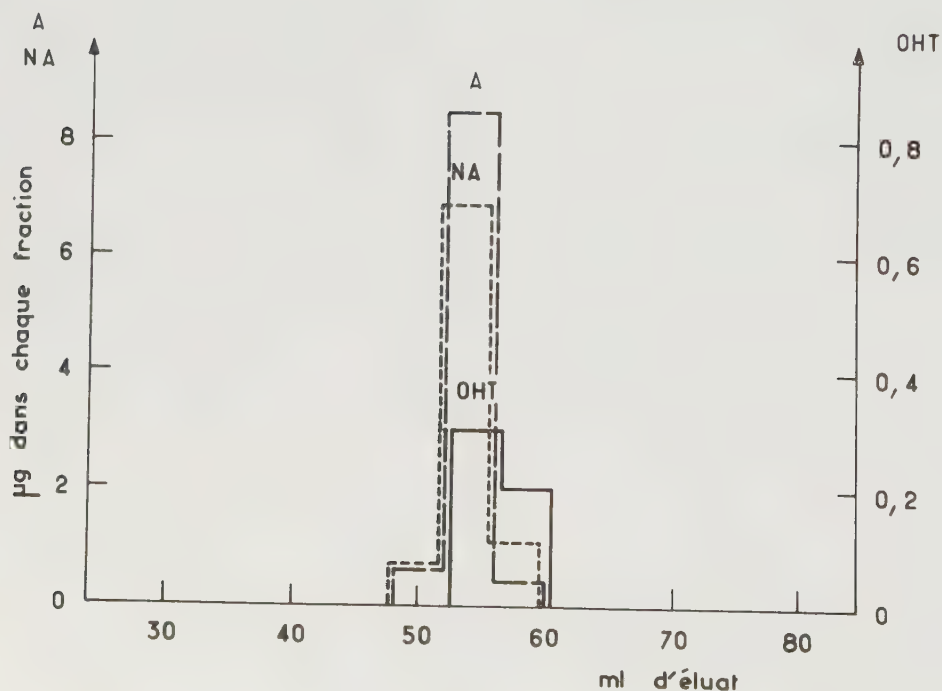


Fig. 6 - $h = 30 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,5 pH d'élution 4,5

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la Noradrénaline (10 μg) en milieu pur.

Conditions Optimales

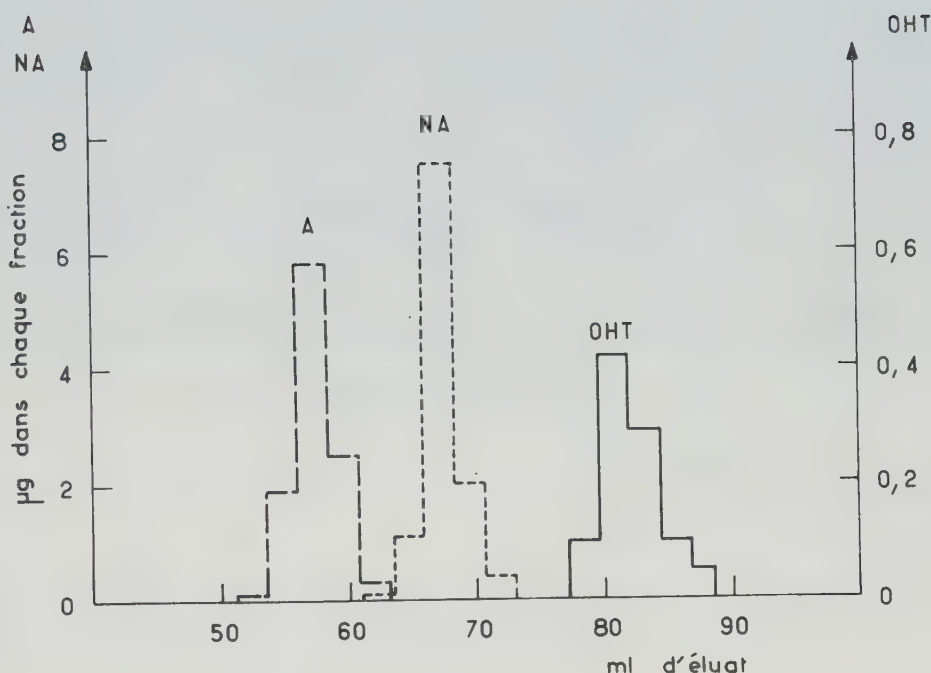


Fig. 7 - $h = 30 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,8; pH d'élution 5

d) Conditions optimales pour l'extraction de la dopamine en milieu pur (fig. 7).

Dans les conditions suivantes :

- diamètre de la colonne = 0,7 cm
- hauteur de la résine = 30 cm
- pH d'adsorption = 5,8
- pH d'élution = 5

l'extraction est satisfaisante; 4,5 ml séparent nettement la dopamine de la noradrénaline; la dopamine est éluée par 12 ml de tampon; le rendement est de 96 p.100; le débit est correct : 7 ml/h.

3/ ETUDE DE L'EXTRACTION DE LA DOPAMINE EN MELANGE AVEC LA NORADRENALINE ET L'ADRENALINE CONTENUES DANS UN MILIEU IMPUR -

Lorsque la dopamine est contenue dans un milieu impur (extraits de médullosurrénale de Rat) les conditions optimales d'extraction définies au paragraphe précédent conduisent à une séparation incomplète de la dopamine des autres catécholamines (fig. 8).

Afin d'améliorer la séparation, nous avons étudié l'effet de la variation du volume d'Amberlite et des pH d'adsorption et d'élution de l'extrait sur l'extraction de la dopamine contenue dans un milieu impur.

Les expériences de mise au point sont résumées dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU X - LES PARAMÈTRES MODIFIANT L'EXTRACTION DE LA DOPAMINE CONTENUE DANS UN MILIEU IMPUR

diamètre de la colonne (cm)	0.7	0.7	0.7	0.9	0.9
hauteur de la résine (cm)	30	35	40	30	30
volume de la résine (cm ³)	11.5	13.4	15.3	19	19
pH d'adsorption	5.8	5.8	5.8	5.8	5.4
pH d'élution	5	5	5	5	4.7
volume de tampon éluant la dopamine (ml)	12	14	14	15	15
rendement d'extraction de la dopamine (%)	86	85	96	63	85
figures	8	9	10	11	12

Les différents diagrammes (fig. 8 à 12) font apparaître les conclusions suivantes :

Remarque : Les quantités d'adrénaline et de noradrénaline reportées sur les diagrammes comprennent l'adrénaline et la noradrénaline présentes dans l'extrait tissulaire de Rat et la charge exogène ajoutée. Par contre, la quantité de dopamine correspond uniquement à la dopamine exogène car nous n'avons pas décelé la présence de cette amine dans l'extrait tissulaire.

a) Effets de l'augmentation de la hauteur de résine (Fig. 8, 9, 10).

Pour un pH d'adsorption (5,8), d'élution (5) et un diamètre de colonne (0,7 cm) constants, l'augmentation de la hauteur de la résine jusqu'à 40 cm permet de séparer la dopamine des autres catécholamines. Cependant, il n'est pas intéressant d'envisager

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la Noradrénaline (10 μg)

Effet du passage d'un milieu pur (Fig. 7) à un milieu impur (Fig. 8)

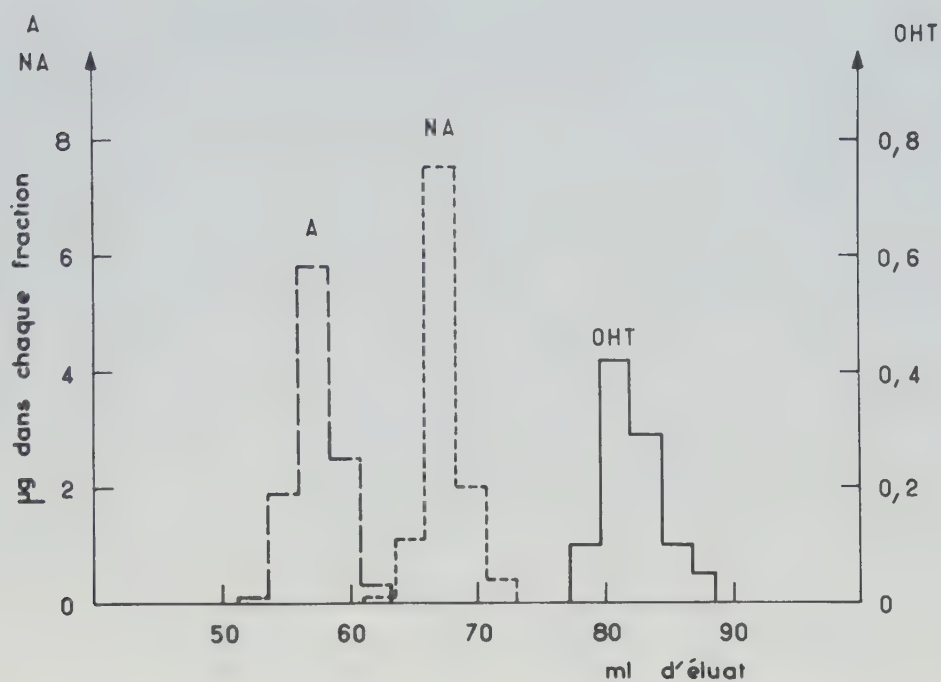


Fig. 7 - milieu pur : $h = 30 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$
pH d'adsorption = 5,8 ; pH d'élution 5

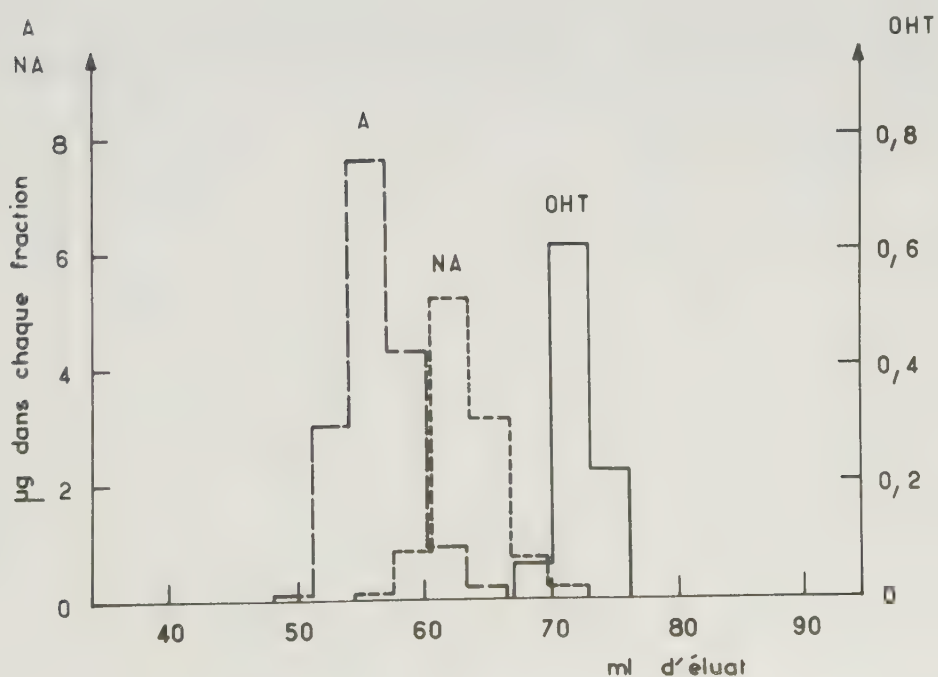


Fig. 8 - milieu impur : $h = 30 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 11,5 \text{ cm}^3$
pH d'adsorption 5,8 ; pH d'élution 5

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la Noradrénaline (10 μg) en milieu impur

Effets de l'augmentation de la hauteur de résine (Fig. 8, 9, 10)

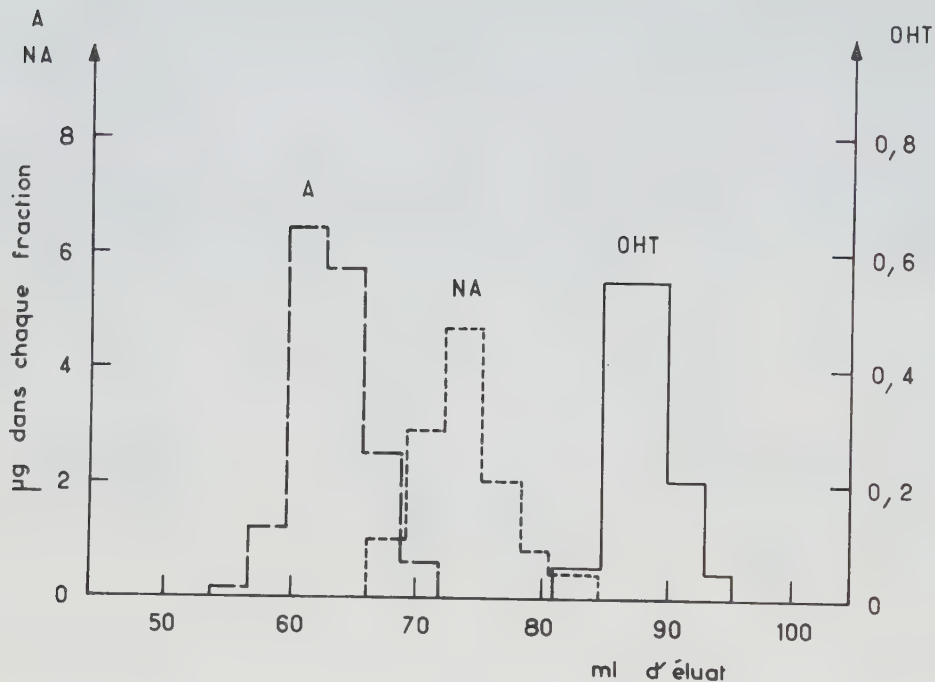


Fig. 9 - $h = 35 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 13,4 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,8 ; pH d'élution 5

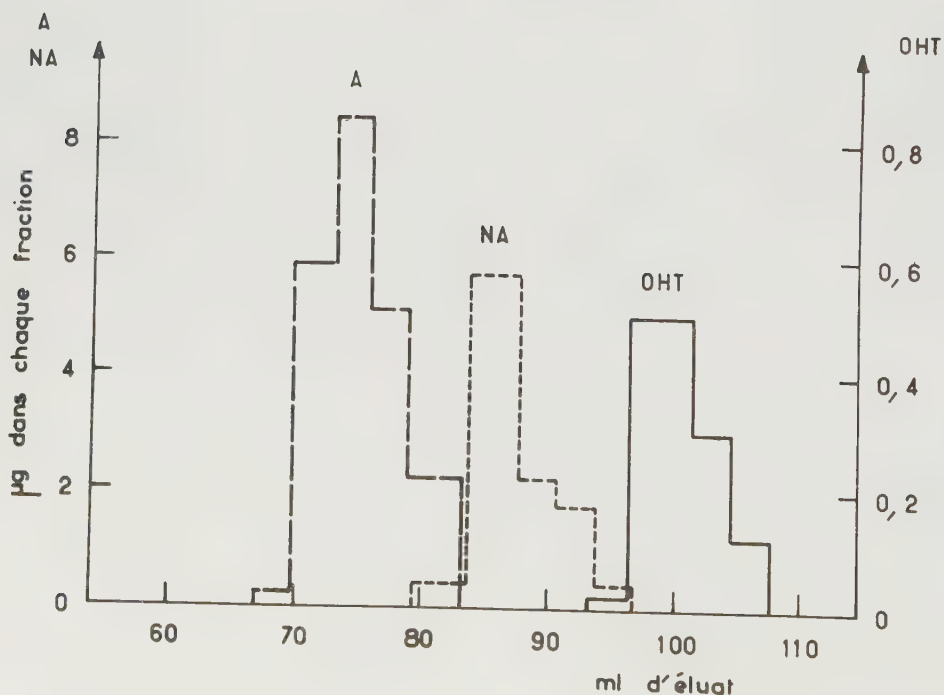


Fig. 10 - $h = 40 \text{ cm}$; $\phi = 0,7 \text{ cm}$; $V = 15,3 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,8 ; pH d'élution 5

Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine (1 μg) en mélange avec de l'Adrénaline (10 μg) et de la Noradrénaline (10 μg) en milieu impur.

Effets de l'augmentation du diamètre de la colonne (Fig. 8 et 11)

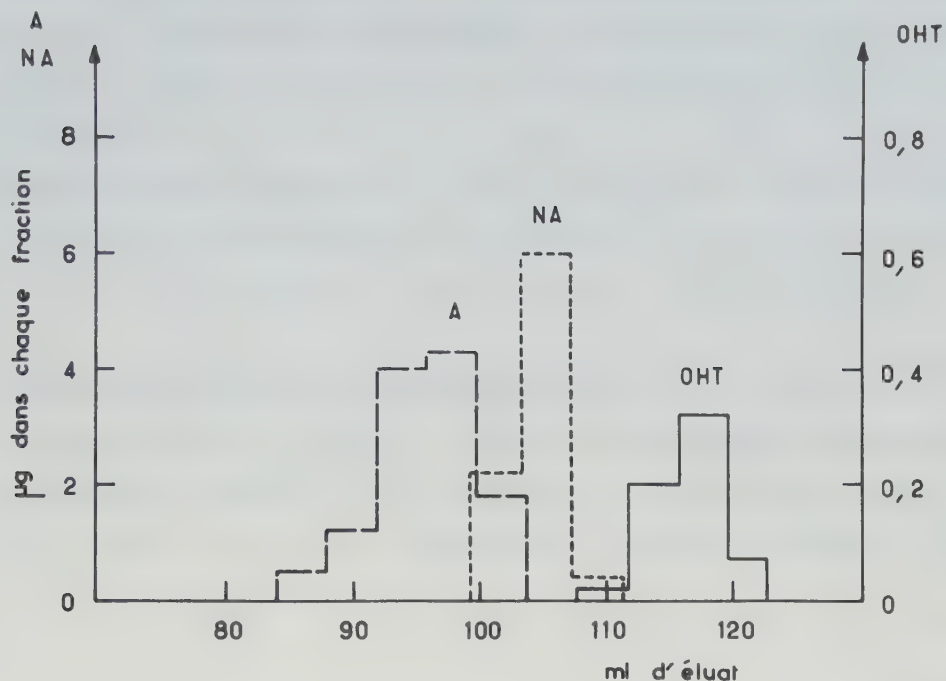


Fig. 11 - $h = 30 \text{ cm}$; $\Phi = 0,9 \text{ cm}$; $V = 19,02 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,8 ; pH d'élution 5

Conditions Optimales d'extraction

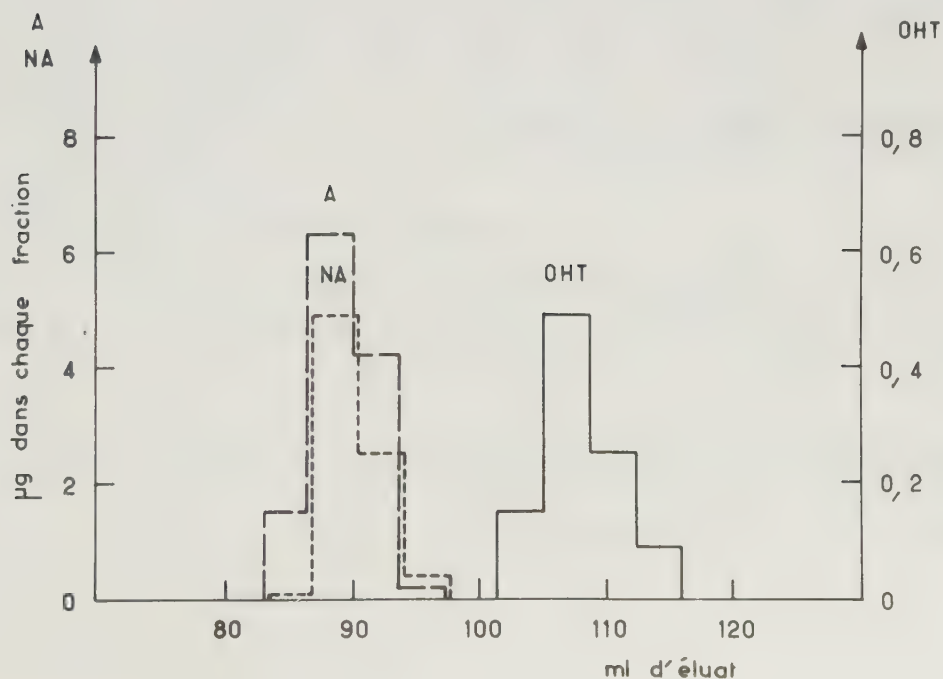


Fig. 12 - $h = 30 \text{ cm}$; $\Phi = 0,9 \text{ cm}$; $V = 19,02 \text{ cm}^3$; pH d'adsorption 5,4 ; pH d'élution 4,7

une extraction par augmentation de la hauteur parce que la durée de l'expérience est trop élevée (3 ml/h. - environ 35 h.).

b) Effets de l'augmentation du diamètre de la colonne (fig. 8 et 11).

La dopamine tend à se séparer de la noradrénaline lorsque le diamètre de la colonne passe de 0,7 à 0,9 cm en maintenant la hauteur de la résine à 30 cm. Dans ces conditions, la durée de l'expérience diminue (8 à 10 ml/h.). L'augmentation du volume d'Amberlite améliore la séparation de la dopamine et il est plus intéressant d'augmenter le diamètre de la colonne que la hauteur de la résine. Le volume de tampon éluant la dopamine varie peu (de 12 à 15 ml).

c) Conditions optimales d'extraction de la dopamine en milieu impur (fig.12).

Les expériences d'extraction effectuées en milieu pur ont montré qu'une baisse du pH d'adsorption et, dans une faible limite, du pH d'élution, avancent l'élution de la noradrénaline et reculent celle de la dopamine.

Ainsi, les conditions suivantes :

- diamètre de la colonne = 0,9 cm
- hauteur de la résine = 30 cm
- pH d'adsorption = 5,4
- pH d'élution = 4,7

sont optimales. 4 ml séparent la dopamine de la noradrénaline; la dopamine est éluee par 15 ml de tampon; le débit est de 8 ml/h.

II - ETUDE DES CONDITIONS DE DOSAGE DE LA DOPAMINE -

La technique de dosage choisie est celle proposée par Fleming et al. (1965) (2ème Partie, chapitre II). Nous avons étudié les conditions optimales du dosage fluorimétrique lorsque la dopamine est contenue dans le tampon d'élution d'Amberlite (acétate d'ammonium 0,4 M).

1/ MODE GENERAL OPERATOIRE POUR L'ETUDE DU DOSAGE -

Les étapes successives du dosage sont :

Dopamine dans l'Acétate d'Ammonium 0,4 M	Iode 0,02 M	Sulfite alcalin 0,02 M	Ascorbate acide
Volume et pH à étudier	0,2 ml	0,2 ml	0,4 ml
	3 mn	3 mn	45 mn

2/ ETUDE SYSTEMATIQUE DES DIFFERENTS PARAMETRES DU DOSAGE FLUORIMETRIQUE -

Le produit d'oxydation de la dopamine (5-6 dihydroxyindole) présente des maxima d'excitation et de fluorescence respectivement à 320 et 385 mμ.

a) Cinétique de la fluorescence.

L'intensité de fluorescence du 5-6 dihydroxyindole augmente rapidement dans les quinze premières minutes suivant l'addition d'ascorbate acide, atteint un maximum à la trentième minute et reste stable durant quatre heures (fig. 13).

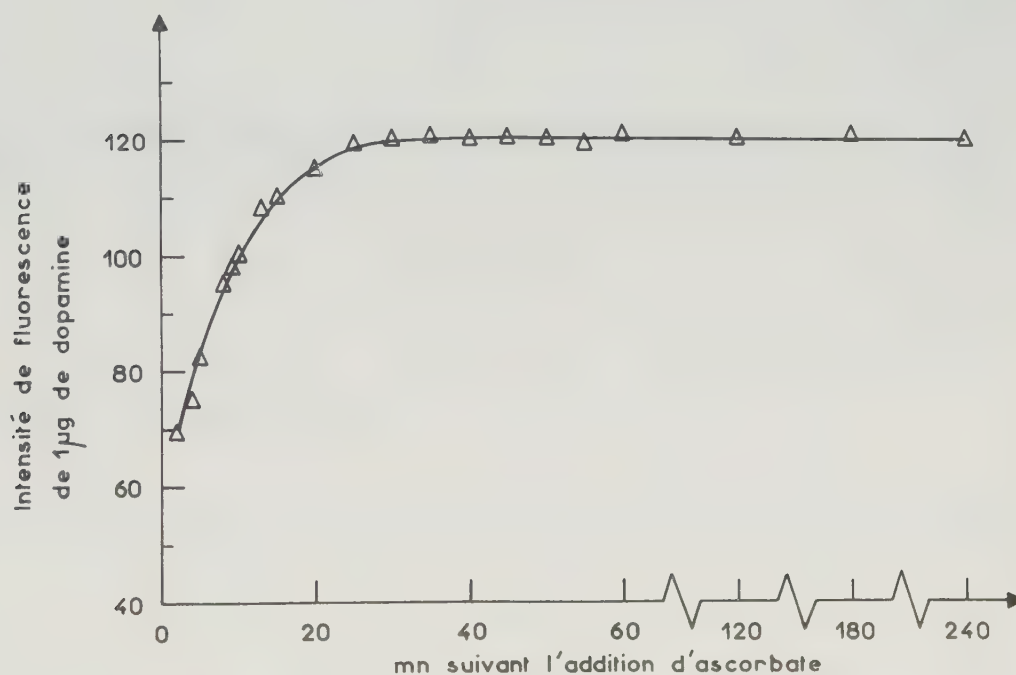


Fig. 13 - Développement de l'intensité de fluorescence après l'addition d'ascorbate

b) Limite du volume à oxyder.

La prise d'essai de 1 ml proposée par les auteurs est insuffisante pour assurer le dosage précis de la dopamine dans un milieu très dilué. L'étude de l'oxydation d'une même quantité de dopamine (0,1 μ g) contenue dans des volumes variant entre 1 et 2 ml montre que le volume maximum pouvant être utilisé est de 1,4 ml (fig. 14). La diminution de l'intensité de fluorescence, pour des volumes supérieurs à 1,4 ml, peut être due non seulement à la dilution des réactifs de dosage mais aussi à la molarité élevée du milieu final au moment de la lecture. Ceci rejoint un principe général d'application de la fluorimétrie, selon lequel les lectures doivent être faites sur un milieu le moins molaire possible.

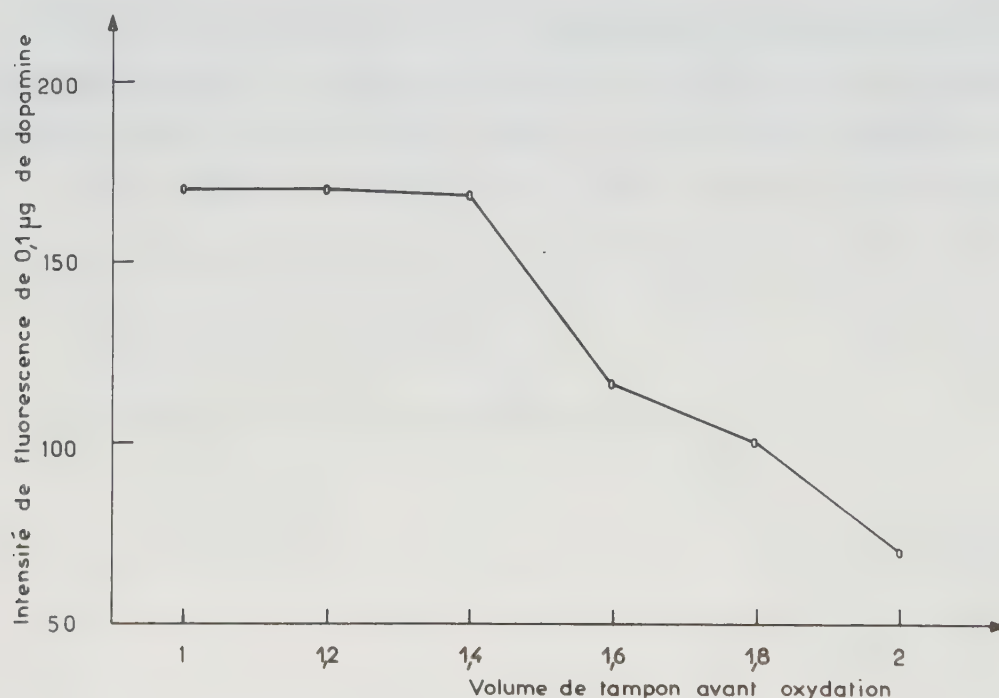


Fig. 14 - Etude du volume optimum d'oxydation (tous les volumes sont ajustés à la même valeur avant la lecture de fluorescence)

c) Etude du pH d'oxydation.

La courbe de fluorescence de 1 μ g de dopamine en fonction du pH du milieu avant l'oxydation montre que la zone de pH optima se situe entre 5,2 et 5,3 (fig. 15).

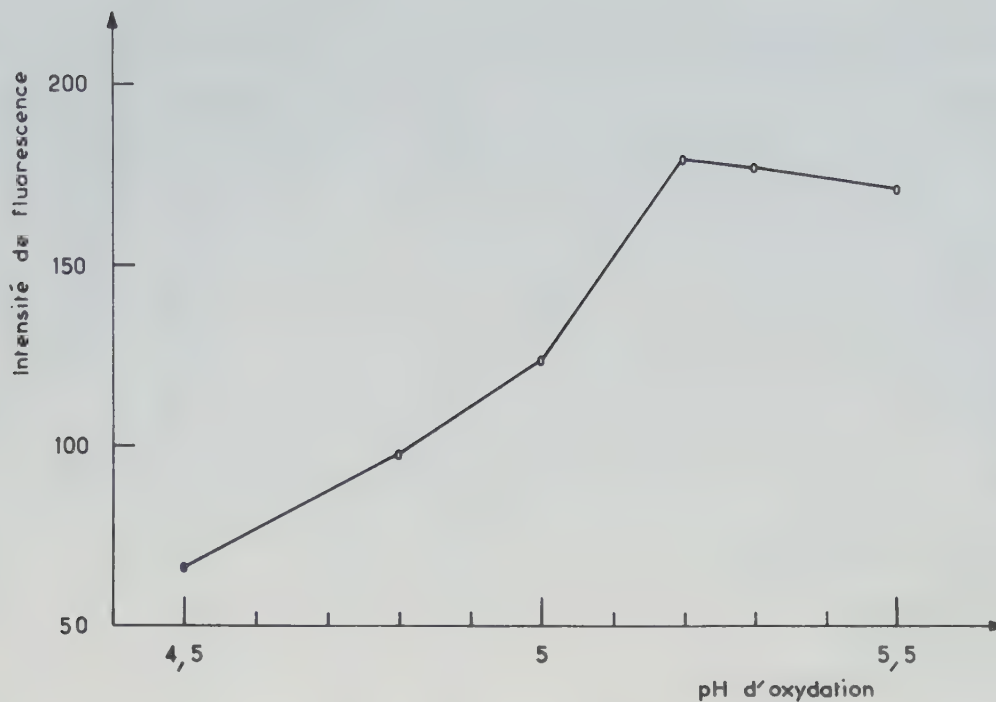


Fig. 15 - Etude du pH optimum de la réaction de fluorescence.

d) Spécificité du dosage.

L'étude de la spécificité, abordée dans notre D.E.A., a été complétée. La DOPA, dont l'oxydation conduit à la formation d'un 5-6 di hydroxyindole (Duliere et Raper, 1930) et la 3-0 méthyldopamine interfèrent sur le dosage de la dopamine (Tableau XI). L'interférence de l'adrénaline (inférieure à 1 p.100) et de la noradrénaline (inférieure à 2 p.100) est négligeable lorsque les trois catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) sont en quantités équimoléculaires dans le milieu.

TABLEAU XI - Fluorescence relative des analogues structuraux de la dopamine -

COMPOSES	Intensité de Fluorescence de quantités équimoléculaires
Dopamine	220
Noradrénaline	4
Adrénaline	2
MéthylDOPA (3 0)	26
DOPA	62
Normétadrénaline	6
Métadrénaline	6
Octopamine	0
Parasympatol	6
Tyramine	0
Acide 3-4 dihydroxymandélique	2
Acide vanillique	4
Acide homovanillique	2
Acide vanylmandélique	2
3 méthoxy-4 hydroxyphénylglycol	4
Sérotonine	4
3-0 méthyldopamine	160
Dihydrophénylsérine	1

e) Sensibilité - Linéarité.

La sensibilité de la réaction, calculée pour une intensité de fluorescence égale à deux fois celle du blanc est de 8 ng soit 4 ng/ml de mélange réactionnel (Fig. 16). La réaction est linéaire jusqu'à 2 µg de dopamine dans la prise d'essai.

f) les gammes de dosage.

. Principe de l'étalonnage interne -

Pour une même concentration, l'intensité de fluorescence développée par un composé varie en fonction du milieu, qui intervient généralement comme inhibiteur et, plus rarement, comme excitateur de la fluorescence. C'est pourquoi toutes les séries de dosage de la dopamine après extraction comprendront un étalon interne.

. Le blanc -

Lorsque le dosage fluorimétrique s'applique à un milieu biologique, la détermination d'un blanc tissu devient très importante. Deux types de blanc ont été testés :

- blanc EDTA : prise d'essai : 1 ml, EDTA 10 p.100 = 0,2 ml
sulfite alcalin : 0,2 ml, ascorbate
acide : 0,4 ml

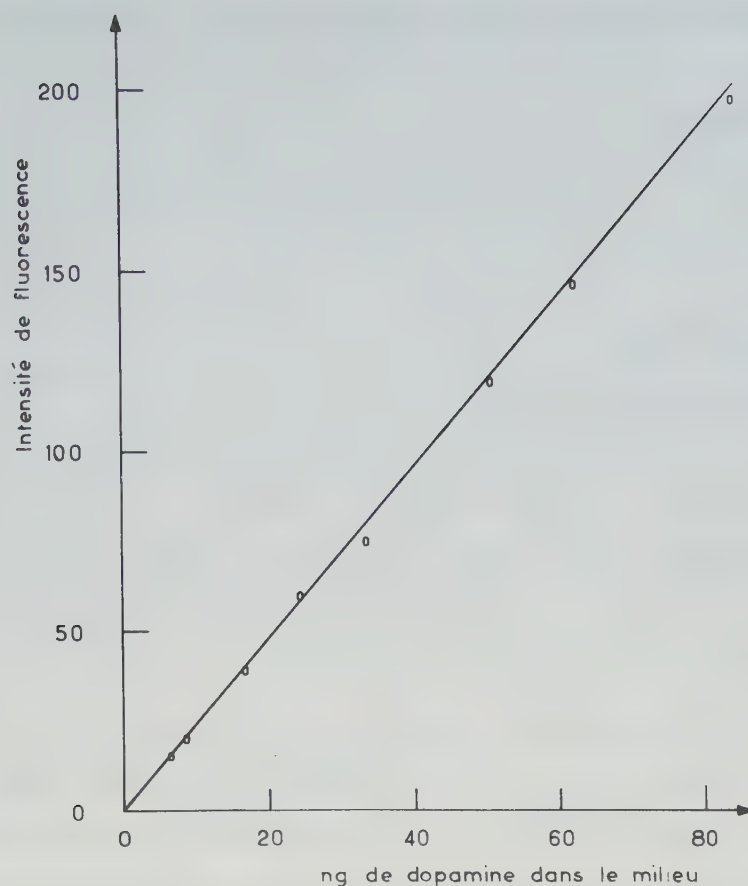


Fig. 16 - Courbe d'étalonnage de la Dopamine en milieu acétate d'ammonium 0,4 M pH 5,2

- Blanc inversé : prise d'essai : 1 ml, ascorbate acide = 0,4 ml
sulfite alcalin : 0,2 ml, Iode = 0,2 ml

Leur fluorescence est souvent égale à celle de la prise d'essai, oxydée dans les conditions normales. Ces deux méthodes de préparation du blanc sont donc inefficaces.

De meilleurs résultats ont été obtenus par des gammes de dosage constituées de prises croissantes d'extrait (par exemple 0,2 et 1 ml). La différence ($F_1 - F_{0,2}$) entre les lectures de chaque prélèvement est proportionnelle à la quantité de dihydroxyindole formée (dans 0,8 ml). Ce mode de dosage est valable dans la mesure où la fluorescence du blanc éluat est faible par rapport à celle de la prise d'essai et reste presque constant.

III - ETUDE CRITIQUE DE L'ENSEMBLE DE LA TECHNIQUE MISE AU POINT (EXTRACTION ET DOSAGE) -

1/ SPECIFICITE DE LA TECHNIQUE -

Les caractéristiques de la méthode d'extraction sur résine et de dosage fluorimétrique, constituent une technique très spécifique pour la dopamine.

a) Substances interférantes.

- La 3-0 Méthyldopamine et la DOPA

Elles interfèrent sur le dosage fluorimétrique de la dopamine (tableau IX) mais sont extraites de l'Amberlite dans des fractions d'élution très éloignées de celles de la dopamine (fig. 17). Ainsi, leur présence éventuelle dans l'extrait ne serait pas un inconvénient.

- L'Octopamine

Elle est extraite sur Amberlite sensiblement au même niveau que la dopamine (fig. 17). Sa présence éventuelle dans l'éluat ne constitue pas un inconvénient puisque l'oxydation, même d'une quantité d'octopamine 100 fois supérieure à celle de la dopamine ne développe aucune intensité de fluorescence à 320-385 mμ.

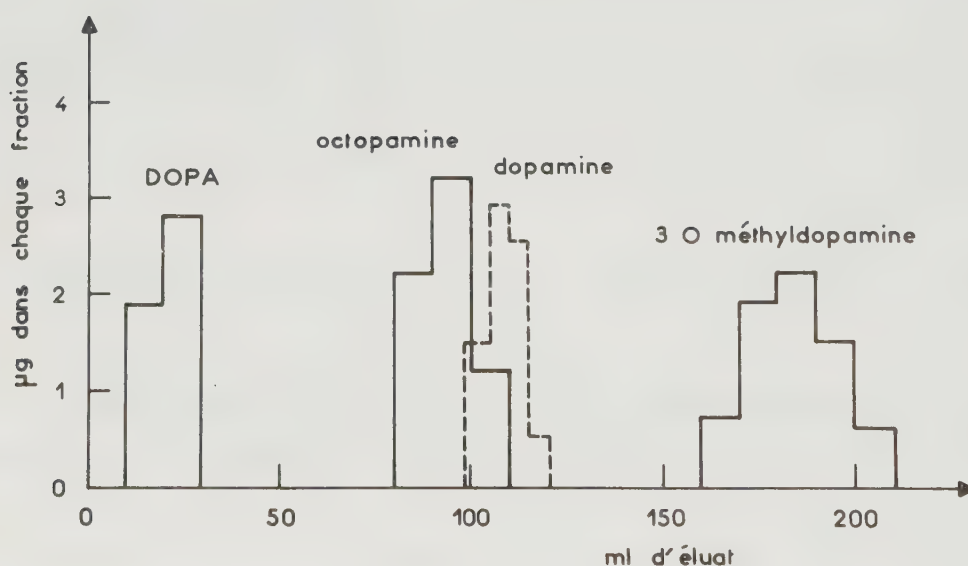


Fig. 17 - Extraction de la DOPA, Octopamine, Dopamine, 3-0 méthyldopamine sur Amberlite CG 50

- La noradrénaline et l'adrénaline

La fraction de 20 µg de noradrénaline-adrénaline est séparée de celle de 1 µg de dopamine par 4 ml d'effluent en moyenne (Fig. 18). Bien que l'interférence de la noradrénaline et de l'adrénaline soit négligeable au niveau du dosage fluori-

métrique (inférieur à 3 p.100) lorsque les trois catécholamines sont en quantités équimoléculaires, cette séparation rigoureuse est indispensable pour doser avec certitude la fraction dopamine, lorsque la concentration en noradrénaline et adrénaline est bien supérieure à celle de la dopamine : c'est le cas de la glande médullosurrénale de Mammifères, dans laquelle la concentration en adrénaline et noradrénaline est 100 fois supérieure à celle de la dopamine.

b) Reproductibilité.

- Extraction

Le diagramme d'élution de la dopamine se déplace très peu d'une manipulation à l'autre (Fig. 18).

La reproductibilité de l'extraction écarte toute possibilité de recouvrement de la fraction dopamine avec celle des autres composés (en particulier noradrénaline et 3-O méthyldopamine) et assure donc une bonne spécificité .

- Lectures de fluorescence

La précision des mesures évaluées sur des quantités égales de dopamine oxydée, et effectuées sur le spectrofluorimètre est inférieure à 3 p.100.

2/ SENSIBILITE DE LA TECHNIQUE -

La sensibilité de la technique dépend de plusieurs facteurs :

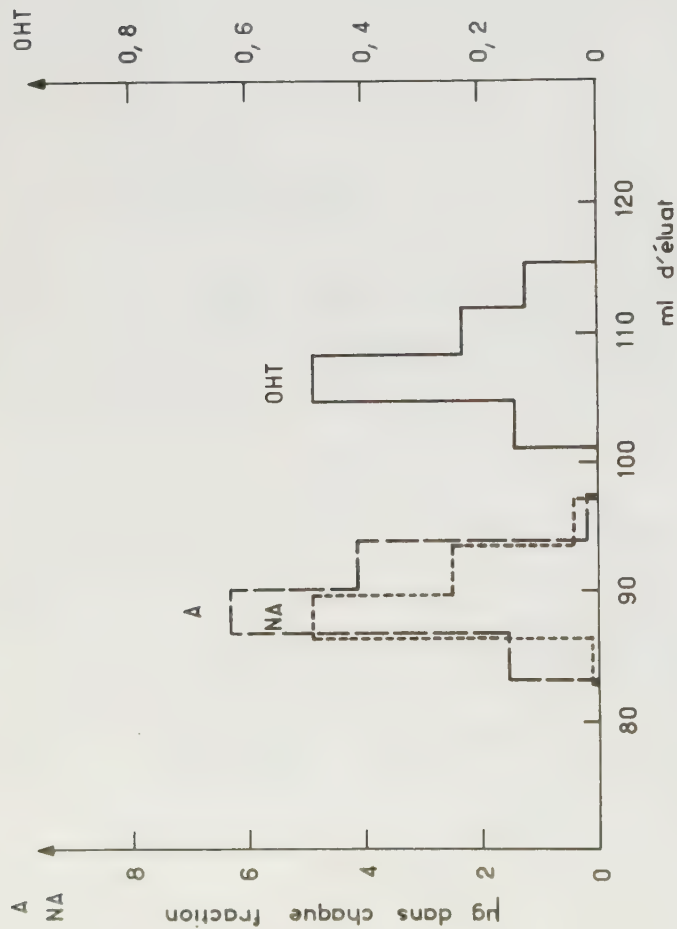
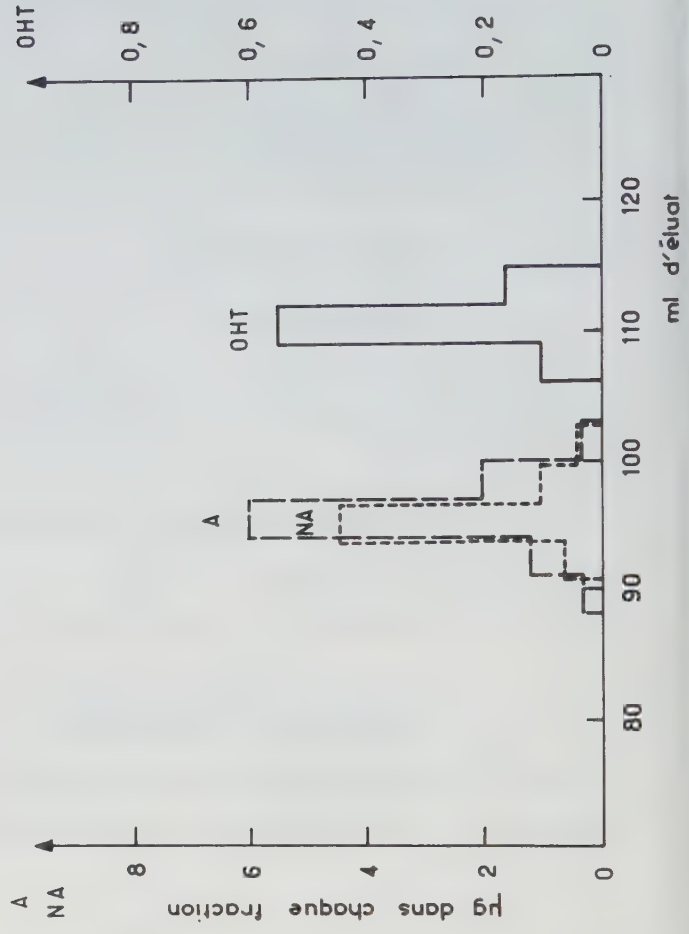
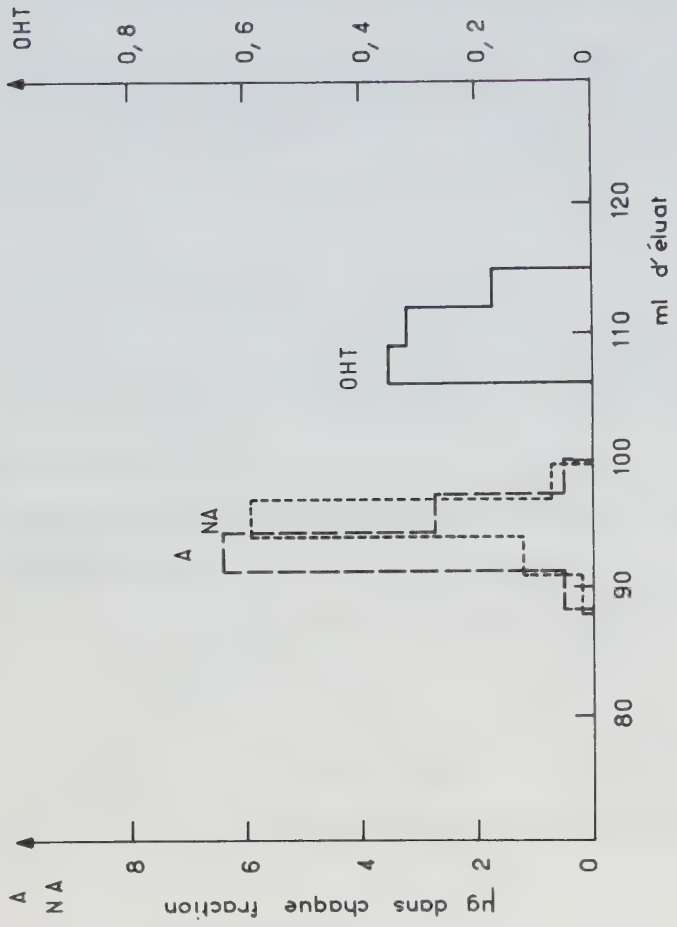
- fluorescence de la résine
- dilution de l'éluat
- rendement de l'extraction

a) Fluorescence de la résine.

L'effluent d'Amberlite peut avoir une fluorescence propre variant d'une fraction d'élution à l'autre et constituant une source d'erreurs pour la détermination de faibles quantités de catécholamines; c'est le cas de la technique proposée par Haggendal (1962) utilisant HCl M comme agent d'élution de l'Amberlite CG 120 (H^+).

Dans nos conditions expérimentales d'extraction, avec l'acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7, en l'absence de tout extrait biologique déposé sur la colonne, l'effluent développe, dans les conditions de dosage de la dopamine, une fluorescence non négligeable qui décroît au fur et à mesure de l'élution (Fig. 19). Cependant, nous n'avons trouvé aucune fluorescence parasite au niveau de la fraction correspondant à l'éluat de la dopamine.

Fig. 18 - Reproductibilité de l'extraction de la Dopamine sur Amberlite CG 50



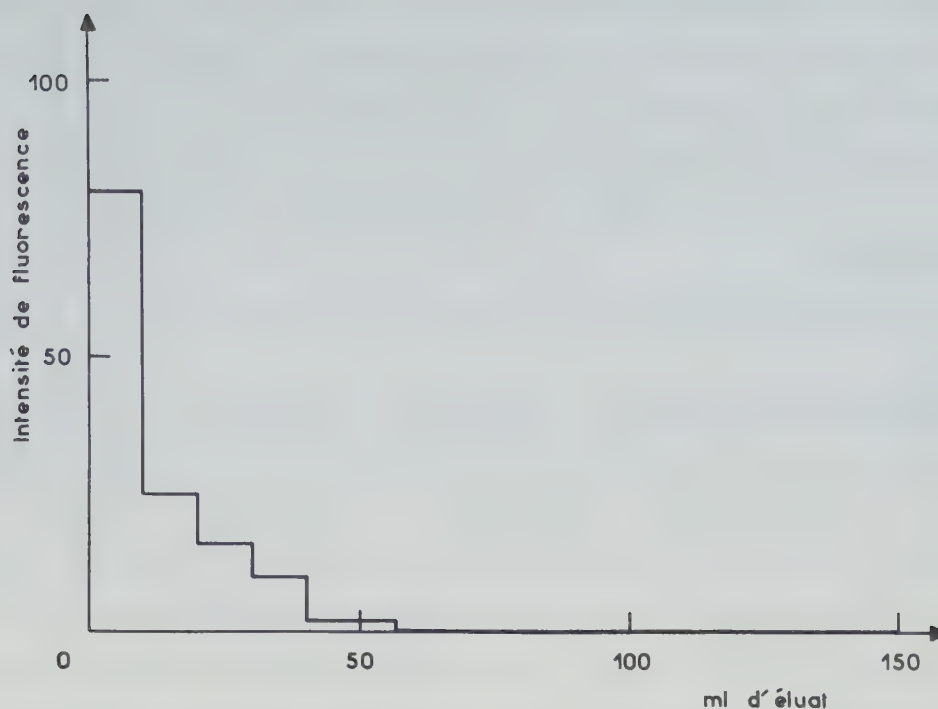


Fig. 19 - Fluorescence (à 320-385 m μ) de l'Amberlite CG 50 pH 5,4 éluée avec de l'acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7

Ainsi, la sensibilité du dosage dans l'acétate d'ammonium 0,4 M ayant élué la colonne d'Amberlite n'est que faiblement modifiée. La réaction de fluorescence est sensible à 10 ng de dopamine soit 5 ng/ml de mélange réactionnel.

b) Effets de la dilution.

- Volume d'élution

Le volume de tampon nécessaire à l'élution de composés d'une résine en général, dépend de leur concentration. Dans nos conditions expérimentales, 1 μ g de dopamine est extrait dans un volume de tampon de 15 ml.

Nous n'avons pas pu réduire ce volume car les deux facteurs, séparation rigoureuse de la dopamine et faible volume d'élution sont incompatibles. L'obtention d'une séparation de la dopamine et de la noradrénaline a représenté pour nous le point essentiel, alors que l'effet de dilution de la dopamine peut être réduit par évaporation ou lyophilisation ultérieure de l'éluat si nécessaire.

- Nature de l'éluant

Le pH réel de l'effluent au moment du dosage est de 5, proche de la valeur optimale d'oxydation de la dopamine. La dilution de l'éluat au niveau du dosage fluorimétrique est donc réduite au maximum.

c) Le rendement.

Plusieurs facteurs affectent le rendement de l'expérience; ce sont en particulier :

- qualité de la résine

La préparation, la conservation et l'utilisation de l'Amberlite CG 50 demandent des soins particuliers. La préparation de l'Amberlite CG 50 est longue; nous avons augmenté les volumes d'acétone et d'eau nécessaires pour le lavage de la résine. Puis elle est gardée dans du tampon acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4 et stabilisée à ce pH par bains de tampon successifs. L'obtention d'un pH stable est absolument indispensable. La résine utilisée peut être régénérée par bains successifs d'acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7 (six au minimum) puis restabilisée à pH 5,4 par bains successifs (10 au minimum) de tampon acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4. La résine n'est jamais régénérée plus de 5 fois car, au-delà, les rendements d'extraction diminuent nettement.

- durée de l'expérience

L'élution de la dopamine se fait en 18 à 20 h. Cette durée est le maximum compatible avec le risque de dégradation de l'amine au cours de l'extraction.

- préparation de l'extrait

Avant son passage sur colonne, la préparation de l'extrait nécessite des précautions, empêchant la dégradation de la dopamine, par oxydation. Ainsi, l'addition d'un agent chélateur (l'EDTA) et d'un antioxydant (l'acide ascorbique) à l'extrait, de même que l'utilisation d'un agent alcalin de molarité inférieure à M pour ajuster le pH de l'extrait à 5,4 sont indispensables pour éviter l'oxydation de la dopamine.

Les rendements d'extraction d'un mélange de dopamine, noradrénaline et adrénaline contenues dans un milieu salin protéique sont de $90,0 \pm 5,4$ p.100 pour la dopamine, 74 p.100 pour la noradrénaline, 84 p.100 pour l'adrénaline.

L'ensemble des résultats (volume d'élution de 1 μ g de dopamine = 15 ml, rendement de l'extraction = 90 p.100, sensibilité de la réaction de fluorescence = 10 ng/1,4 ml de prise d'essai) permet de connaître la sensibilité de la technique : la quantité minimale de dopamine décelable dans la totalité de l'extrait tissulaire

et recueillie dans 15 ml d'éluat est donc de 0,12 µg.

Les diverses étapes techniques de mise au point nous ont permis d'obtenir une méthode d'extraction et de dosage assurant pour la dopamine une spécificité rigoureuse et une très bonne sensibilité.

IV - PROTOCOLE GÉNÉRAL D'EXPÉRIMENTATION POUR LA DÉTERMINATION DE LA DOPAMINE CONTENUE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE -

Il comprend :

- l'extraction tissulaire
- le dosage fluorimétrique

1/ EXTRACTION -

Les conditions d'extraction sont :

colonne	diamètre intérieur : 0,9 cm
Amberlite CG 50	hauteur = 30 cm
	pH = tampon acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4
Extrait tissulaire	pH 5,4
Eluant	Acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7
Fractions	volume mort 50 ml puis fractions de 3 ml

a) La résine.

L'Amberlite CG 50, conservée en suspension dans l'acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4 est réajustée à ce pH par bains successifs de tampon avant chaque expérience.

b) Préparation des extraits tissulaires.

Les corps axillaires et les corps suprarénaux prélevés sur la Roussette anesthésiée sont pesés puis finement découpés avec une pince coupante en inox et mis en suspension dans HCl 0,1 M à raison de 0,2 ml/5 mg de tissu. Les catécholamines diffusent dans le milieu acide pendant deux heures à + 4°C. Nous n'effectuons aucune déprotéïnisation de l'extrait. Puis l'extrait devant être chromatographié est préparé ainsi :

- surnageant de centrifugation du tissu : entre 0,8 et 2,2 ml d'HCl 0,1 M
- 0,3 ml d'acide ascorbique 0,3 p.100
- 0,3 ml d'EDTA 10 p.100
- NH_4OH M puis 0,2 M pour obtenir le pH 5,4
- tampon acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4 : q.s.p. 3 ml

c) L'élution.

L'extrait est déposé sur la colonne sous un volume de 3 ml. Dès la disparition du mènisque l'élution commence par 1 ml d'acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7 et se poursuit avec ce même tampon en recueillant un volume mort de 50 ml puis des fractions successives de 3 ml jusqu'à 130 ml. Bien que le fractionnement de la dopamine soit reproductible, nous préférons maintenir une élution fractionnée afin de suivre un déplacement éventuel du diagramme.

2/ DOSAGES FLUORIMETRIQUES -

a) La dopamine.

Chaque éluat de dopamine de 3 ml compris entre 100 et 120 ml est ajusté à pH 5,2 avec 0,2 ml de NH_4OH 0,4 M. Puis le dosage s'effectue selon le protocole suivant :

Eluat pH 5,2	Tampon acétate d'ammonium 0,4 M pH 5,2	Iode 0,02 M	Sulfite Alcalin 0,02M	Ascorbate Acide
(a) 0,1 ml	q.s.p. 1,4 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,4 ml
(d) 0,1 ml+0,1 μg OHT	"	"	"	"
(b) 0,7 ml	"	"	"	"
(c) 1,4 ml	"	"	"	"
étalon externe : 0,1 μg OHT	"	"	"	"
Blanc	"	"	"	"
		3 mn	3 mn	45mn

Lectures = 320-385 m μ

Les dilutions de dopamine étalon se font dans le tampon acétate d'ammonium 0,4M
pH 5,2

La quantité de dopamine contenue dans l'éluat est calculée ainsi :

$$\text{intensité de fluorescence développée par 0,7 ml d'éluat} = \frac{\frac{(b-a) \times 0,7}{0,6} + (c-b)}{2} = Y$$

$$\mu\text{g de dopamine dans l'éluat : } \frac{Y \times 0,1}{d - a} \times \frac{3,2}{0,7}$$

b) La Noradrénaline et l'Adrénaline.

Elles sont dosées dans les fractions de 3 ml correspondantes (entre le 65° et le 85° ml de l'élution) selon la technique fluorimétrique différentielle aux trihydroxyindoles utilisée au Laboratoire (Peyrin, 1964).

Les éluats acétate d'ammonium 0,4 M sont dosés ainsi :

Eluat	Tampon acétate d'ammonium 0,4M pH 4,7	Phosphate disodique 0,5 M pH 6,5	Phosphate disodique 0,5 M	K ₃ Fe (CN) ₆ 0,25%	Ascorbate alcalin
0,25 ml	q.s.p. 1 ml	1,5 ml	0,5 ml	0,2 ml	1 ml
0,5 ml	"	"	"	"	"
1 ml	"	"	"	"	"
0,5ml + 0,1 µg NA	"	"	"	"	"
Etalon externe A 0,1 µg	"	"	"	"	"
Blanc	"	"	"	"	"
					3 mn

Les dilutions d'adrénaline et de noradrénaline étalon se font dans le tampon acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7

Longueurs d'onde pour les lectures différentielles :

$$A = 410 - 540 \text{ m}\mu \quad (\text{I})$$

$$NA = 365 - 480 \text{ m}\mu \quad (\text{II})$$

Les calculs des proportions relatives d'adrénaline et de noradrénaline sont basés sur la résolution de deux équations tenant compte des lectures de fluorescence et des rapports de fluorescence $\frac{A}{NA}$ dans le système I et II. Ces calculs se font sur ordinateur.

CHAPITRE II

ANALYSE QUANTITATIVE DE LA DOPAMINE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE

Le tissu chromaffine du Poisson Sélacien, la Roussette, représenté par les corps axillaires et les corps suprarénaux, contient de la noradrénaline et de l'adrénaline (Peyrin, 1967) et, de ce fait, présente des caractères biochimiques communs avec ceux de la glande médullosurrénale des Vertébrés supérieurs.

La dopamine n'a jamais été mise en évidence chez la Roussette et sa présence, dans le tissu chromaffine en particulier, n'a jamais été prouvée jusqu'à ce jour. La présence de cette catécholamine dans la médullosurrénale de Mammifère nous fait émettre l'hypothèse que le tissu chromaffine de la Roussette pourrait contenir de la Dopamine, s'ajoutant ainsi aux deux autres catécholamines déjà mises en évidence.

L'application de la technique d'extraction et de dosage que nous avons mise au point (chapitre I) permet la recherche de la dopamine dans ce tissu chromaffine.

I - ANALYSE QUANTITATIVE DE LA DOPAMINE -

Nous avons analysé les corps suprarénaux et les corps axillaires de Roussettes mâles et femelles pêchées pendant les mois de Janvier, Février et Mars.

Le tableau XII résume les résultats obtenus qui sont exprimés en :

- µg de dopamine, de noradrénaline et d'adrénaline/mg de tissu frais
- % de dopamine (de noradrénaline et d'adrénaline) par rapport à la quantité totale de catécholamines obtenue pour un même prélèvement.

TABLEAU XII - LA DOPAMINE DANS LES CORPS SUPRARÉNAUX ET LES CORPS AXILLAIRES DE LA ROUSSETTE -

Organes	Nbre animaux	Poids du Tissue en mg	Dopamine		Noradrénaline NA µg/mg	Adrénaline		$\frac{\text{OHT}}{\text{OHT}+\text{NA}+\text{A}} \times 100$	$\frac{\text{NA}}{\text{OHT}+\text{NA}+\text{A}} \times 100$	$\frac{\text{A}}{\text{OHT}+\text{NA}+\text{A}} \times 100$
			OHT			A				
Corps suprarénaux femelles m ± s _m	4	16.20	0.086		3.79	6.56	0.76		33.9	58.6
	7	27.30	0.171		8.52	5.84	1.17		58.6	40.2
	5	28.45	0.168		6.84	7.30	1.03		41.9	44.8
	5	20.55	0.057		3.86	2.05	0.95		64.7	34.4
	5	20.95	0.096		8.27	9.24	0.54		47.0	55.6
	4	22.85	0.107		7.68	8.01	0.67		48.7	50.7
			0.114 ± 0.017		6.49 ± 0.87	6.50 ± 1.01	0.85 ± 0.09		49.1 ± 4.5	47.3 ± 3.7
Corps suprarénaux mâles m ± s _m	8	20	0.101		8.87	4.18	0.76		67.4	31.8
	5	13.9	0.060		6.25	3.45	0.61		64.0	35.3
	2	19.1	0.044		2.99	1.96	0.88		59.9	39.3
			0.068 ± 0.017		6.03 ± 1.7	3.19 ± 0.65	0.75 ± 0.08		63.8 ± 2.2	35.5 ± 2.2
Corps axillaires mâles m ± s _m	4	21.50	0.054		4.13	4.32	0.63		48.6	50.8
	2	21.55	0.051		4.43	7.16	0.43		38.0	61.5
	2	21.85	0.053		8.75	2.32	0.47		78.7	20.7
			0.052 ± 0.000		5.77 ± 1.49	4.60 ± 1.40	0.51 ± 0.061		55.1 ± 12.2	44.4 ± 12.2
Ensemble du tissu (mâles et femelles) m ± s _m										
			0.087 ± 0.012		6.19 ± 0.98	5.19 ± 0.88	0.74 ± 0.06		54.3 ± 3.8	45.6 ± 3.5

1/ CONCENTRATION EN DOPAMINE -

La concentration moyenne en dopamine est de :

- 0,114 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais $\pm$ 0,017 pour les corps suprarénaux d'animaux femelles
- 0,068 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais $\pm$ 0,017 pour les corps suprarénaux d'animaux mâles
- 0,052 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais $\pm$ 0,000 pour les corps axillaires d'animaux mâles

Le tissu chromaffine dans son ensemble (corps axillaires et corps suprarénaux mâles et femelles) contient $0,087 \mu\text{g} \pm 0,012 \mu\text{g}$ de dopamine/mg de tissu frais.

2/ POURCENTAGE DE DOPAMINE PAR RAPPORT A LA QUANTITE TOTALE DE CATECHOLAMINES -

La concentration moyenne en noradrénaline est de :

- 6,49 $\pm$ 0,87 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais pour les corps suprarénaux d'animaux femelles
- 6,03 $\pm$ 1,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais pour les corps suprarénaux d'animaux mâles
- 5,77 $\pm$ 1,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais pour les corps axillaires d'animaux mâles

La concentration moyenne en adrénaline est de :

- 6,50 $\pm$ 1,01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais pour les corps suprarénaux d'animaux femelles
- 3,19 $\pm$ 0,65 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais pour les corps suprarénaux d'animaux mâles
- 4,60 $\pm$ 1,40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais pour les corps axillaires d'animaux mâles

Pour l'ensemble du tissu chromaffine, le pourcentage de noradrénaline, par rapport à la quantité totale de catécholamine de $54,3 \pm 3,8 \text{ p.100}$, est légèrement supérieur à celui de l'adrénaline qui est de $45,6 \pm 3,5 \text{ p.100}$.

Les concentrations en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tissu frais de noradrénaline et d'adrénaline sont, dans l'ensemble, plus élevées que celles obtenues par les travaux précédents sur le tissu chromaffine de la même espèce de Roussette, mais pêchées pendant la période d'Avril à Octobre (Peyrin, résultats non publiés). Nous avons obtenu pour l'adrénaline dans les corps axillaires mâles $4,6 \pm 1,4 \mu\text{g}/\text{mg}$ et pour la noradrénaline $5,77 \pm 1,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ alors que les travaux précédents ont donné: $4,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ pour l'adrénaline et $2,5 \mu\text{g}/\text{mg}$ pour la noradrénaline. La même élévation s'observe pour l'ensemble des corps suprarénaux : $4,8 \mu\text{g}/\text{mg}$ pour l'adrénaline et $6,2 \mu\text{g}/\text{mg}$ pour la noradrénaline (résultats personnels) contre $3,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ d'adrénaline et $3,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ de noradrénaline. Le facteur saison semble donc influencer les taux de catécholamines. Ainsi, les corps axillaires de Poissons pêchés au cours de la période Avril-Octobre sont moins riches

en adrénaline (4,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$) que ceux des animaux pêchés pendant les mois de Janvier, Février, Mars (6,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

Le pourcentage en dopamine est très faible; il est de :

0,85 $\pm$ 0,09 p.100 dans les corps suprarénaux femelles

0,75 $\pm$ 0,08 p.100 dans les corps suprarénaux mâles

0,51 $\pm$ 0,06 p.100 dans les corps axillaires mâles

Pour l'ensemble du tissu chromaffine, la dopamine constitue en moyenne 0,74 $\pm$ 0,06 p.100 de la quantité totale en catécholamines. Son pourcentage est inférieur à 1 p.100.

II - IDENTIFICATION DU COMPOSÉ ÉLUÉ -

Nous avons étudié les propriétés optiques et les propriétés d'extraction sur Amberlite CG 50 du composé élué.

1/ PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES SUR RESINE -

Parallèlement à chaque expérience, nous avons conduit dans les mêmes conditions expérimentales l'extraction d'une solution de dopamine ^{14}C (0,2 μCi) contenue dans un milieu salin et dont la nature chimique a été vérifiée par autoradiographie.

Les diagrammes d'élution établis par comptage des éluats ^{14}C , en scintillation liquide, et par dosage fluorimétrique du composé stable extrait du tissu chromaffine, se superposent exactement (fig. 20).

2/ PROPRIETES SPECTROFLUORIMETRIQUES -

Les éluats, correspondant à la position de la dopamine témoin et oxydés par l'iode, montrent la présence d'un fluorophore ayant un maximum d'excitation à 320 $\text{m}\mu$ et un maximum de fluorescence à 385 $\text{m}\mu$. Ces maxima correspondent exactement à ceux obtenus par oxydation de 0,1 μg de dopamine étalon (Fig. 21).

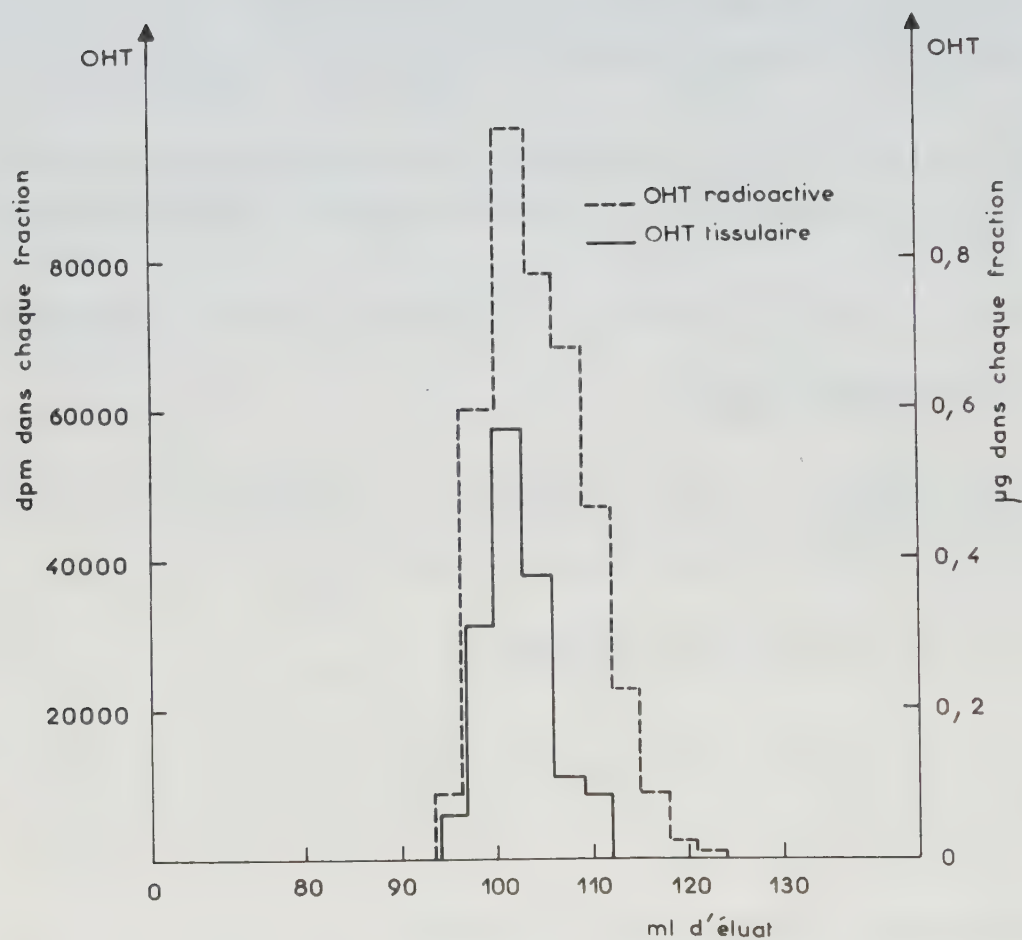
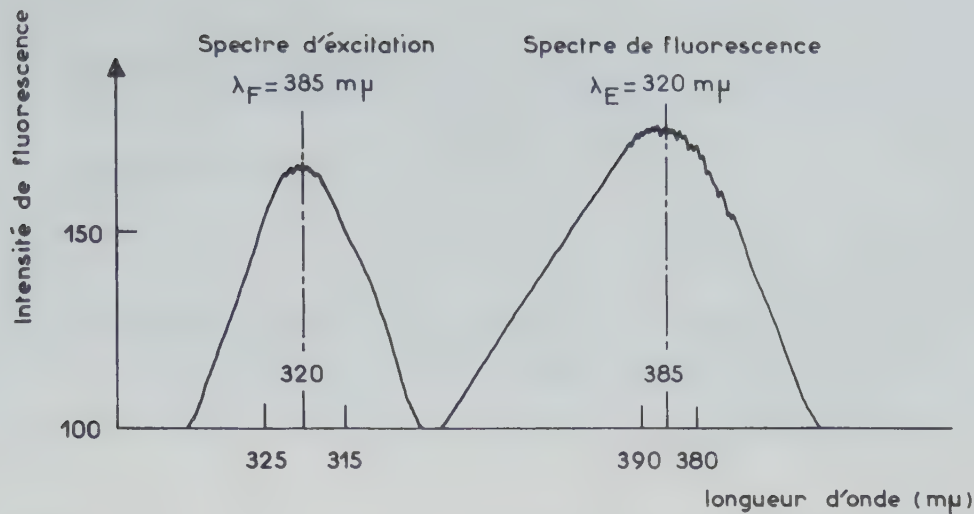
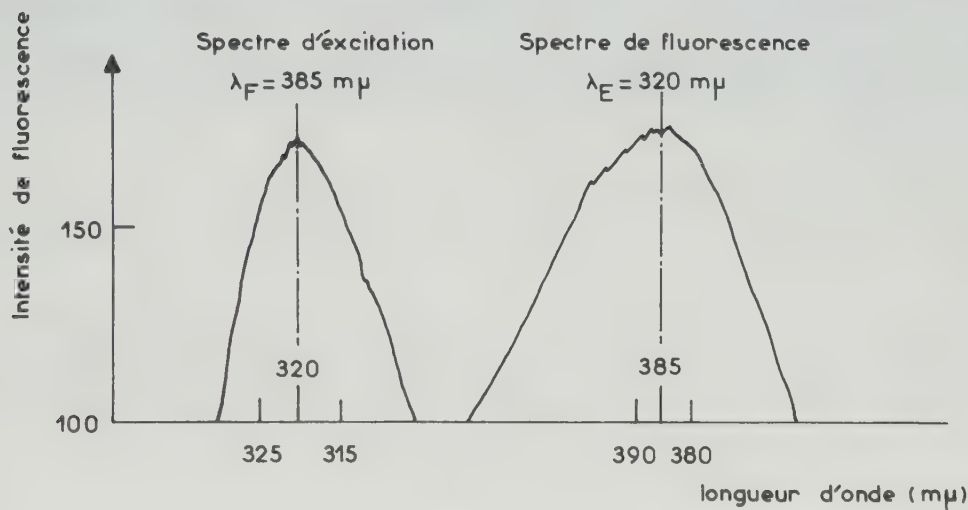


Fig. 20 - Extraction sur Amberlite CG 50 de la Dopamine du tissu chromaffine de la Roussette et de la Dopamine radioactive témoin



Dopamine étalon (0,1 µg)



Eluat de corps suprarénaux

Fig. 21 - Comparaison des spectres d'excitation et de fluorescence de la dopamine étalon et de l'éluat de tissu chromaffine de Roussette

III - CONCLUSION -

Le passage sur Amberlite CG 50 du tissu chromaffine de la Roussette permet d'extraire une substance, élue entre le 100^è et le 120^è ml, ayant des propriétés chromatographiques sur résine identiques à celles de la dopamine et les mêmes caractéristiques de fluorescence.

L'identité de ces propriétés physicochimiques permet d'affirmer que la dopamine est un constituant normal du tissu chromaffine de la Roussette.

CHAPITRE III

L'HYDROXYLATION DE LA DOPAMINE EN NORADRÉNALINE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE

Le tissu chromaffine de la Roussette contient l'équipement enzymatique permettant de méthyler la noradrénaline en adrénaline en présence de la S adénosylméthionine; les propriétés physicochimiques de cette enzyme de méthylation diffèrent de la PNMT du Rat (pH optimum, thermostabilité, force ionique) mais la nature, les cofacteurs de la réaction et la localisation intracellulaire de l'enzyme sont les mêmes pour ces deux espèces (Peyrin et al., 1972b).

La dopamine et la noradrénaline sont présentes dans le tissu chromaffine de la Roussette.

La dopamine est-elle dans ce tissu précurseur de la noradrénaline, comme dans la glande médullosurrénale de Mammifère ? Cette hypothèse demande en effet à être vérifiée. L'étude bibliographique (Ière partie, chapitres I et II) a montré l'importance de certaines voies accessoires pour la biosynthèse de l'adrénaline; en particulier, la dopamine peut se transformer en un autre composé que la noradrénaline ou cette dernière présente dans un tissu, n'est pas nécessairement le produit d'hydroxylation de la dopamine.

Rappelons en effet que :

- Chez les insectes, la dopamine est essentiellement le précurseur de la N acétyldopamine (Sekeris et Karlson, 1966),

- Dans les glandes salivaires du Poulpe (*Octopus octopus*) l'octopamine, malgré la présence de dopamine, pourrait être un précurseur de la noradrénaline.

Il est donc nécessaire de vérifier s'il existe une relation biochimique entre la dopamine et la noradrénaline présentes dans le tissu chromaffine de la Roussette. Existe-t-il un système enzymatique permettant l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline ?

I - CONDUITE DES EXPERIENCES - EXPRESSION DES RESULTATS -

1/ CONDUITE DES EXPERIENCES - RAPPELS -

L'étude de l'étape enzymatique conduisant à l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline se fait in vitro, par incubation des corps axillaires de Roussettes avec le substrat dopamine ^{14}C et les cofacteurs. Le volume final de la réaction est de 1 ml. Après incubation pendant 20 mn à 30° à l'air ambiant, le contenu du milieu est extrait sur Amberlite CG 50 afin de séparer la dopamine radioactive du produit ^{14}C néoformé.

Le blanc incubation comprend le substrat et les cofacteurs en présence de la préparation tissulaire portée pendant 10 mn à 100° et diluée dans 0,05 ml de TCA 6 p.100. Il est mené parallèlement à chaque expérience.

Le détail de ces différentes étapes techniques a été exposé dans la 2ème partie chapitre III.

2/ EXPRESSION DES RESULTATS -

a) Les diagrammes.

La radioactivité des éluats d'Amberlite (fractions de 3 ml) est mesurée par la technique de la scintillation liquide. Nous avons tracé, pour chaque expérience, le diagramme représentant les composés élués en désintégration par minute (dpm) en fonction du volume d'élution.

Dans tous les cas (blancs ou expériences) les diagrammes montrent trois zones radioactives.

1° pic : entre le 20ème et le 60ème ml d'élution

Ce pic correspond à un composé non identifié, appelé "impureté X" qui représente en moyenne 3 p.100 de la radioactivité totale élue. Il s'agit peut-être du produit de désamination oxydative de la dopamine, l'acide 3-4 dihydroxyphénylacétique, qui est élué de l'Amberlite dans cette zone. Cependant, quelle que soit la nature de ce composé nous en tiendrons compte dans les calculs ultérieurs.

2ème pic : entre le 75ème et le 99ème ml d'élution

Ce pic correspond à la noradrénaline. Les diagrammes des expériences "blanc incubation" montrent la présence d'une impureté que nous appelons "Y" élue à ce niveau.

3ème pic : à partir du 100ème ml d'élution

Ce pic correspond à la dopamine ^{14}C .

Sur les diagrammes nous ne représenterons pas l'impureté X .

b) Calculs numériques.

La noradrénaline formée au cours des incubations correspond à la somme de noradrénaline vraie formée au cours de la réaction enzymatique et de "l'impureté Y" qui est éluée au même niveau. Nous obtiendrons donc la noradrénaline vraie par une différence qui ne sera correcte que si nous adoptons les deux modes d'expression suivants :

1° mode d'expression : pourcentage relatif de chaque pic.

Après élution, la radioactivité correspondant à chaque pic est exprimée en pourcentage par rapport à la radioactivité éluée totale. Ce pourcentage, ou proportion relative, est donc indépendant de la quantité initiale de radioactivité et surtout indépendant du rendement d'extraction global . Ainsi, nous pouvons soustraire directement le pourcentage de "l'impureté Y" trouvée dans le blanc du pourcentage de la noradrénaline formée au cours de l'incubation pour obtenir le pourcentage de noradrénaline vraie formée enzymatiquement par rapport à la radioactivité totale éluée.

2ème mode : noradrénaline vraie formée en nanomoles/h/100 mg de tissu

Pour déterminer le nombre de nanomoles de noradrénaline vraie formée au cours de la réaction enzymatique, nous devons supposer que le rendement global d'extraction sur Amberlite est également le rendement d'extraction de chaque composé. Avec cette hypothèse le nombre de nanomoles correspondant à chaque pic est obtenu en multipliant chaque pourcentage relatif par le nombre total de nanomoles radioactives déposées sur la résine. Remarquons, avec cette hypothèse, que le calcul est indépendant du rendement.

La différence entre le nombre de nanomoles de noradrénaline global et de nanomoles correspondant à "l'impureté" donne le nombre de nanomoles de noradrénaline vraie formée au cours de la réaction enzymatique.

II - LE SUBSTRAT DOPAMINE $2\text{-}^{14}\text{C}$ - "L'IMPURETÉ Y" -

La dopamine ^{14}C stockée à -20°C est décongelée extemporanément. Les deux lots de dopamine ^{14}C reçus du C.E.A. ou du Radiochemical Center d'Amersham contiennent une

"impureté Y" qui possède les mêmes caractéristiques physicochimiques de chromatographie sur Amberlite CG 50 (élution entre le 75ème et le 95ème ml) ou sur papier ($R_f = 0,11$) que la noradrénaline.

Le pourcentage de cette impureté augmente au cours des décongélations successives comme le montre le tableau suivant.

TABEAU XIII - Variations du pourcentage de formation de l'impureté radioactive contenue dans les lots de dopamine ^{14}C

	Dopamine ^{14}C dans HCl 0,01M (CEA) 10 nanomoles		Dopamine ^{14}C dans HCl 0,01M (Amersham) 10 nanomoles	
	1ère	2ème	1ère	2ème
Décongélation				
Milieu contenant la Dopamine avant extraction sur Amberlite	a	a	a	a
Température d'extraction	ambiante	ambiante	ambiante	ambiante
Pourcentage de Y	0,11 %	0,59%	0,20%	0,50%

a : tampon acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4 = 2 ml, EDTA 10 p.100 = 0,3 ml
acide ascorbique 0,3 p.100 = 0,3 ml; NH_4OH 0,2 M et eau q.s.p. pH 5,4 et 3 ml

Bien que présente en faible quantité, "l'impureté Y" constitue un problème expérimental car elle interfèrera avec la noradrénaline radioactive ultérieurement formée au cours de la réaction enzymatique.

C'est pourquoi, afin d'éliminer cette impureté, nous avons dû purifier la dopamine ^{14}C en chambre froide en utilisant la technique d'extraction sur Amberlite mise au point. Seuls les éluats contenant la dopamine pure sont recueillis sur anti-oxydant (0,1 ml d'acide ascorbique à 0,3 p.100/ml) et sont acidifiés avec HCl R.P. jusqu'à pH 2. La dopamine purifiée est contenue dans de l'acétate d'ammonium 0,4 M acidifié; elle est répartie en différents lots stockés à $-20^{\circ}C$ et décongelés extemporanément.

Cependant, les lots de dopamine ^{14}C purifiée contiennent encore "l'impureté Y" qui peut, à nouveau, être extraite de l'Amberlite. Il est cependant possible de stabiliser le pourcentage de Y à une valeur inférieure à 1 p.100 en conduisant l'étape d'extraction à $+4^{\circ}C$ (tableau XIV).

TABEAU XIV - Variations du pourcentage de formation de l'impureté radioactive
contenue dans les lots de dopamine ^{14}C purifiée

	Dopamine ^{14}C purifiée (dans acétate d'ammonium 0,4 M acidifié) 2 $\mu\text{Ci/ml}$ 10 nanomoles			Dopamine ^{14}C purifiée (dans acétate d'ammonium 0,4 M acidifié) 0,73 $\mu\text{Ci/ml}$ 10 nanomoles			
Décongélation	4ème	5ème	5ème	5ème	5ème	5ème	5ème
Milieu contenant la Dopamine avant extraction sur Amberlite	b	c	d	a	e	f	g
Température d'extraction	ambiante	ambiante	ambiante	4°	4°	4°	4°
Pourcentage de Y	1,21%	1,50%	1,64%	0,09%	0,82%	0,79%	0,86%

a : acétate d'ammonium 0,2 M pH 5,4 = 2 ml; EDTA 10 p.100 = 0,3 ml; acide ascorbique 0,3 p.100 = 0,3 ml; NH_4OH 0,2 M et eau q.s.p. pH 5,4 et 3 ml

b : tissu porté à 100°, acétate d'ammonium = 200 μmoles ; acide ascorbique = 6 μmoles ; acide fumarique = 10 μmoles ; ATP = 10 μmoles ; catalase = 100 unités; NaOH 0,5 M et eau q.s.p. pH 5,5 et 1 ml.
Puis : EDTA 10 p.100 = 0,3 ml; acide ascorbique 0,3 p.100 = 0,3 ml; NH_4OH 0,2 M et eau q.s.p. pH 5,4 et 3 ml.

c : milieu identique à b mais *incubation* 20 mn à 20°C avant l'addition d'EDTA

d : milieu identique à c mais *incubation* 20 mn à 30°C

e : milieu identique à d mais *N éthylmaleimide* = 4 μmoles avant l'incubation

f : milieu identique à e mais NaOH 0,5 M q.s.p. pH 5

g : milieu identique à e mais NaOH 0,5 M q.s.p. pH 6

Le pourcentage de "l'impureté Y" peut être diminué lorsque l'extraction s'effectue à +4°C et stabilisé lorsque les lots de dopamine ^{14}C ne sont décongelés qu'une seule fois extemporanément. Il semblerait augmenter lorsque le milieu contient des cofacteurs avant l'extraction.

Afin d'éviter une forte dégradation du substrat, la plupart des étapes expérimentales utilisant la dopamine ^{14}C s'effectueront à +4°C.

II - ETUDE DE LA RÉACTION ENZYMATIQUE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX D'INCUBATION -

La préparation des divers milieux d'incubation a été décrite dans la 2ème partie, chapitre III.

L'enzyme dopamine β oxydase n'a jamais été étudiée chez les Vertébrés inférieurs et chez la Roussette en particulier, nous n'avons donc aucune connaissance concernant sa localisation intracellulaire et ses inhibiteurs endogènes éventuels.

Aussi, nous avons choisi de travailler, au départ, avec un milieu d'incubation le plus simple possible, contenant l'enzyme apportée par le tissu, le substrat purifié dopamine ^{14}C et les cofacteurs indispensables pour l'activité enzymatique (1ère partie, chapitre III) c'est-à-dire l'acide fumarique et l'acide ascorbique. Nous avons ajouté de l'ATP toujours additionné aux milieux d'incubation in vitro.

A partir de ce milieu d'incubation de base, nous avons étudié l'effet de différents paramètres sur la réaction d'hydroxylation de la dopamine dans le but d'augmenter le rendement en noradrénaline formée dans le tissu chromaffine de la Roussette.

Les différents facteurs étudiés sont :

- la catalase
- la N éthylmaleimide
- l'augmentation de la préparation tissulaire
- la variation du pH

1/ EFFET DE LA CATALASE -

Les expériences de Levin et Kaufman (1961) ont montré le rôle protecteur de la catalase vis à vis de la dopamine β oxydase de la médullosurrénale de Boeuf purifiée. C'est pourquoi nous avons ajouté 100 unités de catalase (soit 0,034 mg) à 1 ml du milieu d'incubation. Les résultats sont résumés dans le tableau XV. La noradrénaline vraie correspond à celle formée au cours de l'incubation, déduction faite du blanc.

TABLEAU XV - Effet de la catalase sur la formation de Noradrénaline

Substrat	Poids du tissu	Milieu d'incubation	pH	RESULTATS		
				Y x 100 radioact.éluee	NA vraie	
					NA x 100 radioact.éluee	nmoles/h/100mg
Dopamine ¹⁴ C purifiée 0,22 µCi = 10 nmoles	4 mg	A	5	1,21	0	0
	4 mg	A	5,5	1,21	0,11	0,82
" "	4 mg	A+catalase 100 unités	5	1,21	0,09	0,67
	4 mg	A+catalase 100 unités	5,5	1,21	0,31	2,3

A = 1 ml du milieu d'incubation contient en µmoles = acétate d'ammonium 200 ;
acide ascorbique = 6 ; acide fumarique = 10 ; ATP = 10

Il semble que l'addition de 100 unités de catalase au milieu d'incubation augmente la quantité de noradrénaline ¹⁴C formée enzymatiquement. A pH 5,5 l'activité enzymatique s'accroît de 180 p.100 en présence de 100 unités catalase.

2/ EFFET DE LA N ETHYLMALÉIMIDE

La dopamine β oxydase de la glande médullosurrénale du Mammifère est une enzyme particulaire, située dans le granule chromaffine et qui possède des inhibiteurs endogènes cytoplasmiques (1ère partie, chapitre III). La N éthylmaléimide augmente l'activité enzymatique in vitro : il possède le double rôle d'inactiver les inhibiteurs endogènes cytoplasmiques et de modifier la perméabilité de la membrane granulaire permettant une meilleure accessibilité du site enzymatique vis à vis du substrat.

Afin d'augmenter la quantité de noradrénaline ¹⁴C formée dans le tissu chromaffine de la Roussette, nous avons donc ajouté de la N éthylmaléimide à 1 ml du milieu d'incubation, soit directement, soit en préincubation avec 1'ATP 10 mn à 30°C (2ème partie, chapitre III).

Les résultats de ces expériences sont les suivants (Tableau XVI).

Incubation vraie

Blanc d'incubation

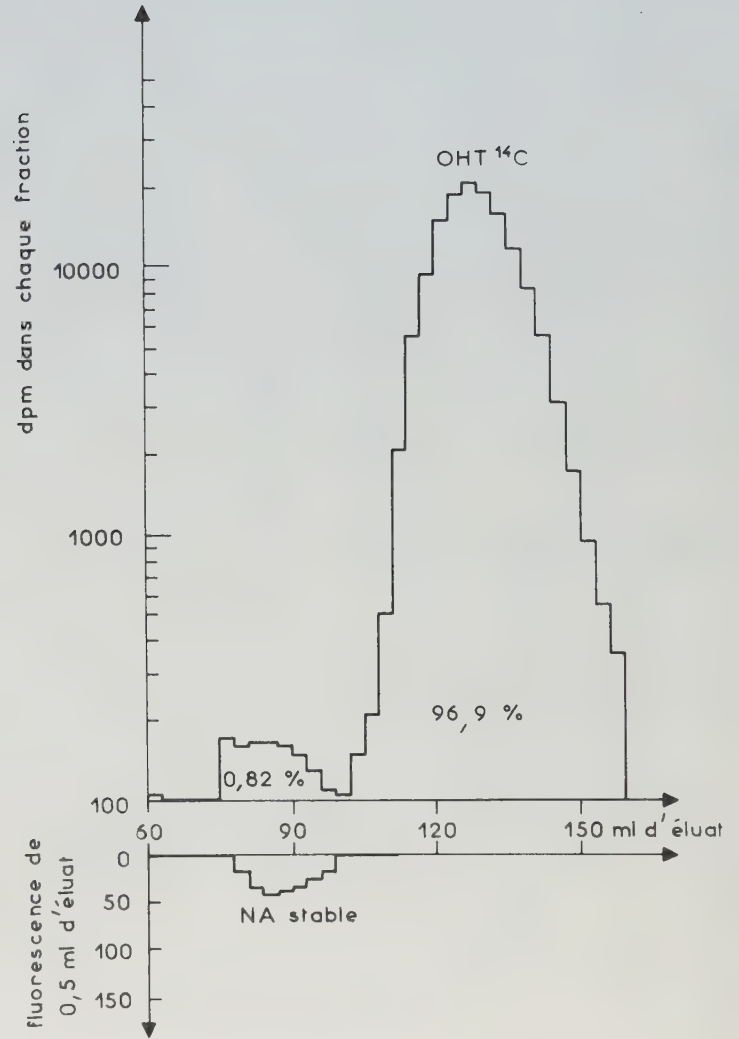
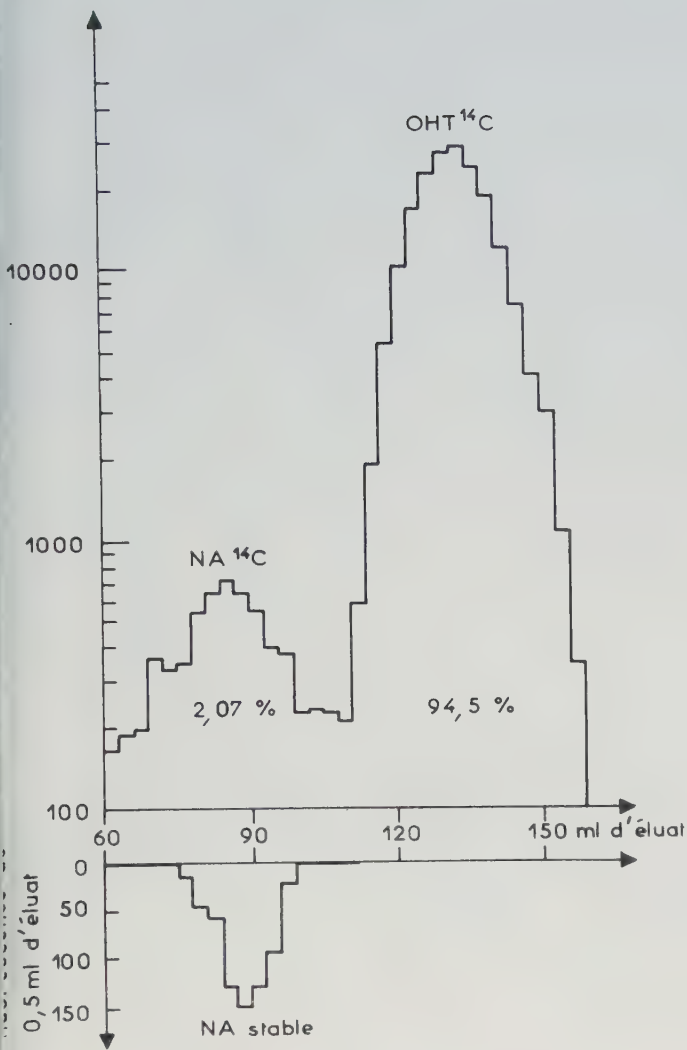


Fig. 22 - Extraction du milieu après incubation sur Amberlite CG 50.
 Les conditions expérimentales d'incubation sont : corps axillaires = 4,5 mg
 Dopamine ¹⁴C = 10 nanomoles; acétate d'ammonium 200µmoles ;
 acide ascorbique = 6 µmoles ; acide fumarique = 10 µmoles ; ATP = 10 µmoles
 catalase = 100 unités, NEM = 4 µmoles; NaOH 0,5 M et eau q.s.p. pH 5,5 et 1 ml.
 incubation 20 mn à 30°C

Incubation vraie

Blanc d'incubation

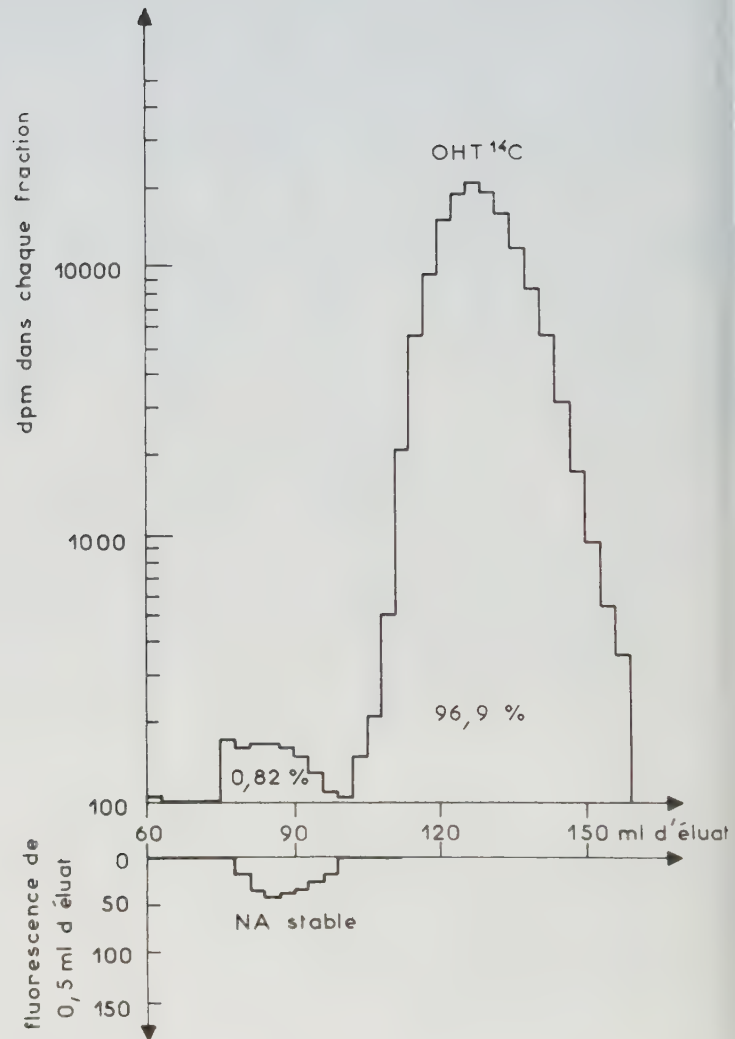
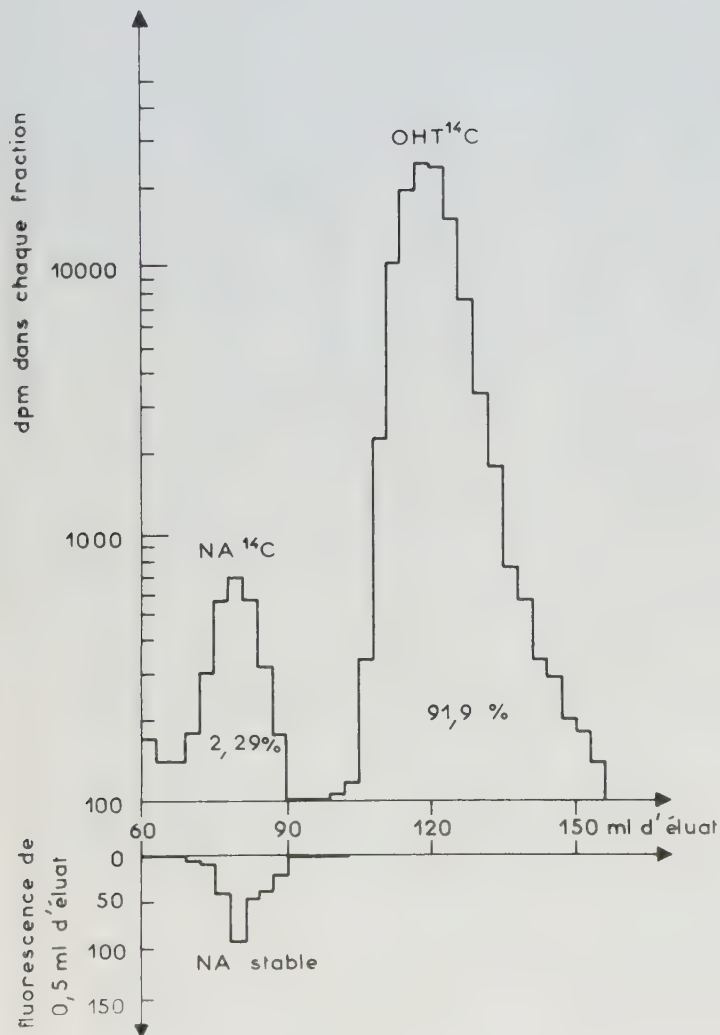


Fig. 23 - Extraction sur Amberlite CG 50 du milieu après incubation.
Conditions d'incubation identiques à celles de la figure 22

Incubation vraie

Blanc d'incubation

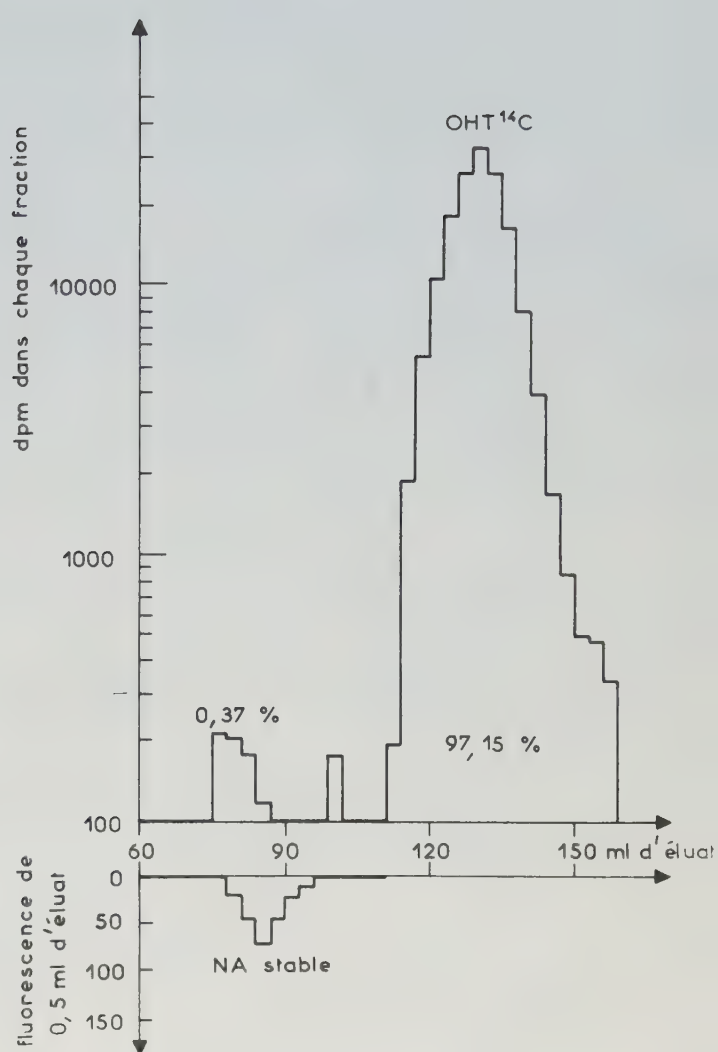
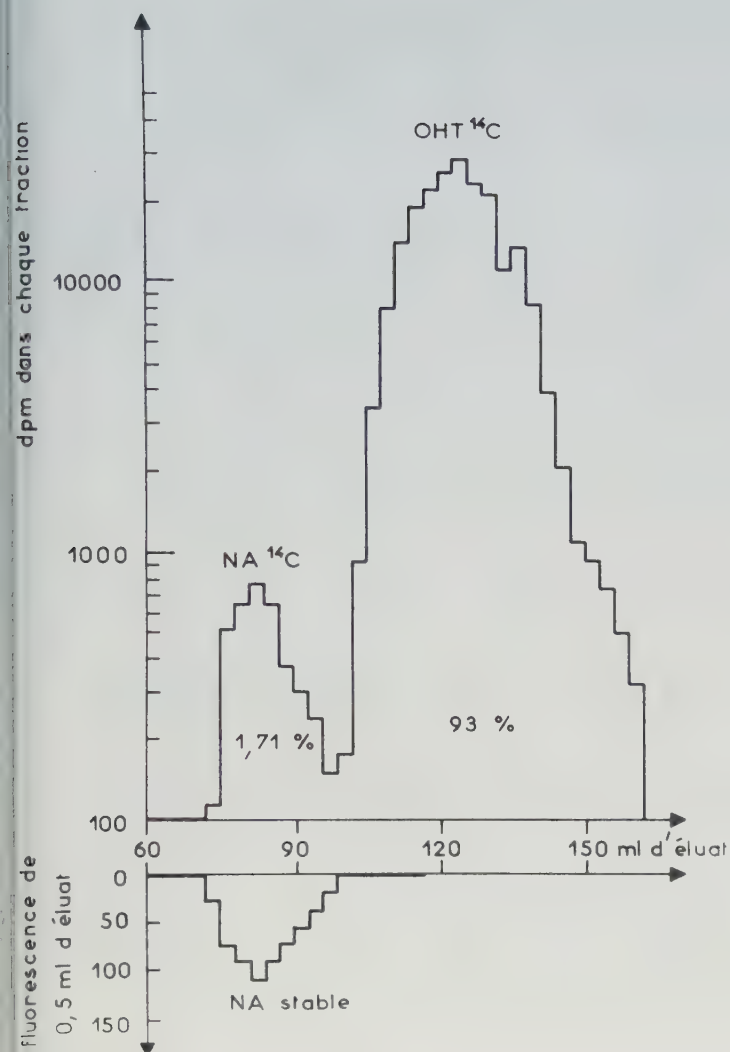


Fig. 24 - Extraction sur Amberlite CG 50 du milieu après incubation.
 Les conditions expérimentales d'incubation sont : corps axillaires = 4,4 mg
 Dopamine ¹⁴C = 10 nanomoles; acétate d'ammonium 200 µmoles;
 acide ascorbique = 6 µmoles; acide fumarique = 10 µmoles ; ATP = 10 µmoles
 catalase 100 unités, NEM = 10 µmoles en préincubation;
 NaOH 0,5 M et eau q.s.p. pH 5,5 et 1 ml
 incubation 20 mn à 30°C

TABLEAU XVI - *Effet de la N éthylmaléimide sur la formation de noradrénaline*

Substrat	Poids du tissu	Milieu d'incubation	pH	RESULTATS		
				Y x 100 radioact.éluée	Noradrénaline vraie NA x 100 radioact.éluée	nmol/h/100mg
Dopamine ¹⁴ C purifiée 0,22 µCi = 10 nmoles	4 mg	B	5,5	1,21	0,31	2,3
	4,5 mg	B + NEM = 4 µmoles	5,5	0,82	1,25	8,1
			5,5	0,82	1,47	9,8
" "	4,4 mg	B + NEM préincubé = 4 µmoles	5,5	0,37	1,08	7,4
" "	4,4 mg	B + NEM préincubé = 10 µmoles	5,5	0,37	1,3	9,2

B = 1 ml du milieu d'incubation contient en µmoles : acétate d'ammonium = 200 ;
acide ascorbique = 6 ; acide fumarique = 10 ; ATP = 10 ; catalase = 100 unités

Les diagrammes (fig. 22 à 24) montrent le pic de noradrénaline formé dans ces conditions d'incubation

L'addition de 4 µmoles de N éthylmaleimide au milieu d'incubation augmente la quantité de noradrénaline vraie formée qui passe de 2,3 nanomoles/h/100 mg à $8,95 \pm 0,85$ nanomoles/h/100 mg.

La préincubation de l'homogénat pendant 10 mn à 30° en présence de N éthylmaléimide et d'ATP n'améliore pas significativement le pourcentage de noradrénaline formée.

3/ EFFET DE L'AUGMENTATION DE LA QUANTITE DE TISSU -

Le milieu d'incubation contient des quantités de tissu, donc d'enzyme , croissantes. Le nombre de nanomoles de substrat reste constant.

TABLEAU XVII - *Effet de l'augmentation tissulaire sur la formation de noradrénaline*

Substrat	Poids du tissu	Milieu d'incubation	pH	RESULTATS		
				Y x 100 radioact.éluée	Noradrénaline vraie	
					NA x 100 radioact.éluée	nmoles/h/100mg
Dopamine purifiée $^{14}\text{C}=0,22\mu\text{Ci}$ 10 nmoles	4,5mg	C	5,5	0,82	1,36	8,95
	7,7mg	C	5,5	1	0,47	1,85
	8,7mg	C	5,5	0,89	0,41	1,41

C = 1 ml du milieu d'incubation contient en μmoles : acétate d'ammonium = 200 ;
acide ascorbique = 6 ; acide fumarique = 10 ; ATP = 10 ; catalase = 100 unités ;
N éthylmaleimide = 4

L'augmentation de tissu, en maintenant la concentration du substrat constante, diminue fortement l'activité enzymatique. Si 100 p.100 représente le nombre de nanomoles formé/h/100 mg avec 4,5 mg de tissu, l'activité enzymatique diminue de 79 p.100 lorsque l'incubation s'effectue avec 7,7 mg et de 84 p.100 avec 8,7 mg de tissu (fig.25)

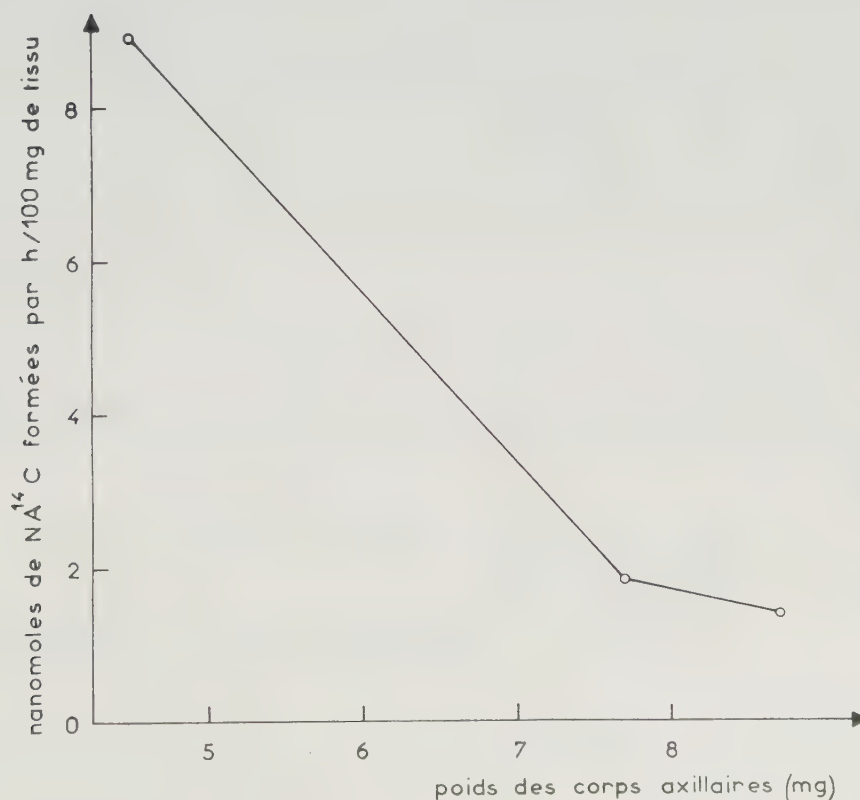


Fig. 25 - Variation de la formation de noradrénaline en fonction de l'augmentation tissulaire. Milieu d'incubation C pH 5,5

4/ LE pH DE LA REACTION ENZYMATIQUE -

Le pH de la réaction n'a pas été étudié de façon systématique. Quatre séries d'expériences, différentes quant au poids de tissu utilisé ou aux cofacteurs contenus dans le milieu, ont été effectuées à des pH variant entre 5 et 6,4. Les résultats sont les suivants (tableau XVIII et fig. 26).

TABLEAU XVIII - Effet du pH sur la formation de la noradrénaline

Substrat	Poids du Tissu	Milieu d'incubation	pH	RESULTATS			FIG.
				Y x 100 radioact.éluée	Noradrénaline vraie		
					NA x 100 radioact.éluée	nmol/h/100mg	
Dopamine ¹⁴ C non purifiée = 0,58 µCi = 10 nmoles	5 mg	D	6,4 6	0,59 0,59	0,26 0,28	1,56 1,68	26 ₄
Dopamine ¹⁴ C purifiée = 0,22 µCi = 10 nmoles	8,7 mg	C	6 5,5	0,86 0,89	0,22 0,41	0,76 1,41	26 ₃
" "	4,5 mg	C	5,5 5	0,82 0,79	1,36 0,49	8,9 2,35	26 ₁
" "	4 mg	B	5,5 5	1,21 1,21	0,31 0,09	2,3 0,67	26 ₂

D = 1 ml du milieu d'incubation contient en µmoles : phosphate de potassium = 100 ;
acide ascorbique = 6 ; acide fumarique = 10 ; ATP = 10

C = 1 ml du milieu d'incubation contient en µmoles : acétate d'ammonium = 200 ; acide
ascorbique = 6 ; acide fumarique = 10 ; ATP = 10 ; catalase = 100 unités ;
N éthylmaleimide = 4

B = 1 ml du milieu d'incubation contient en µmoles : acétate d'ammonium = 200 ;
acide ascorbique = 6 ; acide fumarique = 10 ; ATP = 10 ; catalase = 100 unités

Une diminution du pH de 5,5 à 5 entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 71 à 73,5 p.100.

Une augmentation du pH de 5,5 à 6 entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 45 p.100.

Une augmentation du pH de 6 à 6,4 entraîne une diminution de l'activité enzymatique de 7,1 p.100. Cette diminution ne semble pas cependant significative.

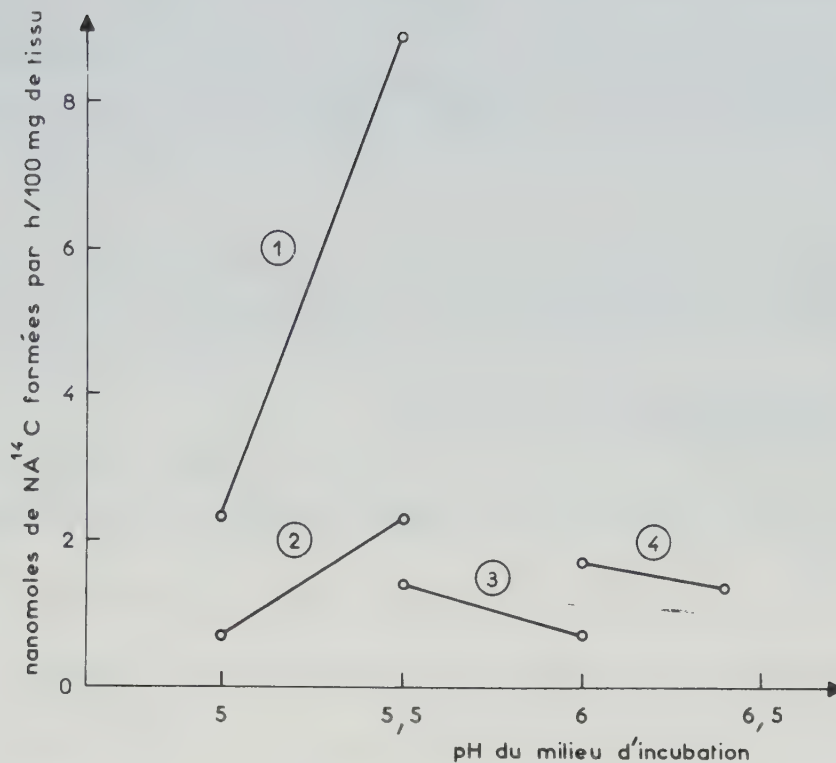


Fig. 26 - Variation de la formation de noradrénaline en fonction du pH du milieu d'incubation
Les différentes conditions d'incubation sont détaillées dans le Tableau XVIII

Ces résultats ne peuvent cependant pas être comparés globalement, mais par déduction, nous pouvons penser que le pH optimum de la réaction enzymatique se situe pour des valeurs proches de pH 5,5

IV - IDENTIFICATION DU PRODUIT ^{14}C NÉOFORMÉ -

Il est identifié par ses caractéristiques de migration sur Amberlite CG 50 et sur papier, selon les deux techniques décrites dans la 2ème partie, chapitre III.

1/ PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES SUR AMBERLITE CG 50 -

La noradrénaline stable, ajoutée au milieu comme entraîneur à la fin de l'incubation, est dosée par fluorimétrie dans les éluats d'Amberlite. Ainsi, nous avons contrôlé la bande passante théorique de la noradrénaline ^{14}C pour chaque expérience.

La superposition du diagramme de fractionnement de la noradrénaline stable dosée chimiquement et du produit ^{14}C compté en scintillation liquide est totale (fig. 22 à 24).

Nous pouvons donc conclure que le produit radioactif extrait en moyenne entre le 75ème et le 99ème ml de l'élution est de la noradrénaline ^{14}C .

2/ PROPRIETES CHROMATOGRAPHIQUES SUR PAPIER -

100 μl du milieu après incubation, migrent sur papier. Les spots radioactifs sont révélés par autoradiographie après un temps de pose de 4 mois (2ème partie, chapitre III).

La présence d'une tache noire ayant le même R_f à 0,11 que celui de la noradrénaline stable prouve que le milieu contient de la noradrénaline (fig. 27).

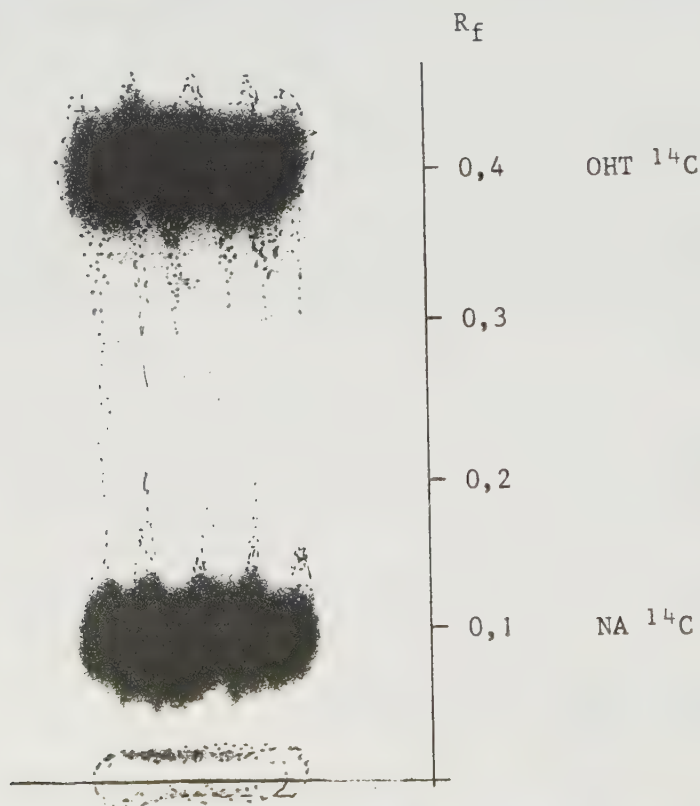


Fig. 27 - Autoradiographie des radiochromatogrammes obtenus après incubation des corps axillaires en présence de dopamine ^{14}C

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Rappelons que, au début de cette étude, nous avons cherché à résoudre les deux principaux points suivants :

- l'existence de la dopamine dans le tissu chromaffine de la Roussette
- le rôle de la dopamine dans la biosynthèse de la noradrénaline.

Nos résultats expérimentaux prouvent que :

- la dopamine est bien un constituant du tissu chromaffine, et que
- l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline est possible dans ce tissu

Nous discuterons ces résultats afin d'en préciser la validité et les limites.

I - LA DOPAMINE CONSTITUANT DU TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE -

1/ ANALYSE DES RESULTATS -

Pour cette étude, nous avons mis au point une technique d'extraction sur Amberlite CG 50 et de dosage de la dopamine très spécifique. Elle permet de séparer totalement (par 3 ml d'effluent) la fraction adrénaline-noradrénaline de celle de la dopamine, et d'éliminer avec certitude l'interférence de la 3-O méthyldopamine, de la DOPA, de l'octopamine et de la dihydroxyphénylsérine (3ème Partie, chapitre I, § III). La présence de ces composés dans le tissu chromaffine n'est cependant pas exclue.

Nous avons extrait du tissu chromaffine de la Roussette un composé qui possède les mêmes propriétés de fluorescence et d'adsorption sur Amberlite CG 50 que la dopamine étalon. Nous pouvons affirmer que ce composé analysé est de la dopamine.

Les résultats obtenus ne sont pas dispersés. Pour l'ensemble du tissu chromaffine, la concentration en dopamine en $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($0,087 \pm 0,012$) et son pourcentage par rapport à la quantité totale de catécholamines ($0,74 \% \pm 0,06$) sont faibles.

La différence de concentration obtenue pour les corps suprarénaux mâles ($0,068 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,017$) et femelles ($0,114 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,017$) est significative ($p < 0,05$). Les corps suprarénaux femelles semblent donc plus riches en dopamine que les corps suprarénaux mâles (cependant, le nombre d'animaux étudiés n'est que de 15 pour les mâles et 30 pour les femelles).

Le pourcentage en dopamine, par rapport à la quantité totale de catécholamines, n'est pas significativement différent entre les corps suprarénaux femelles et mâles ($0,75\% \pm 0,07$ et $0,85 \pm 0,09$) ($t = 0,85$).

2/ DISCUSSION -

Le pourcentage de la dopamine dans le tissu chromaffine de la Roussette inférieur à 1 p.100 est du même ordre de grandeur que celui déjà connu pour la glande médullosurrénale de Mammifères (1ère Partie).

Rappelons qu'il est de 2 p.100 pour la glande du Mouton, 0,6 p.100 chez le Boeuf, 0,3 p.100 chez la Vache.

Cependant, le tissu chromaffine de la Roussette avec $0,087 \mu\text{g}/\text{mg}$ paraît plus riche en dopamine que la glande médullosurrénale de Boeuf ($0,035 \mu\text{g}/\text{mg}$).

Ce résultat confirme les travaux précédents (Peyrin, 1967) ayant montré que la concentration en adrénaline est deux fois plus forte dans le tissu chromaffine de la Roussette que dans la glande médullosurrénale de Chien, et que celle en noradrénaline est 2,5 fois plus élevée.

Les faibles concentrations en dopamine trouvées dans le tissu chromaffine de la Roussette ne peuvent nous conduire à aucune hypothèse sur le rôle physiologique de cette amine, autre que celui de précurseur de la noradrénaline. Seul, un travail ultérieur sur l'analyse du contenu en dopamine dans tous les tissus nous permettra d'étudier le rôle physiologique éventuel de la dopamine chez la Roussette.

I - L'HYDROXYLATION DE LA DOPAMINE EN NORADRENALINE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE -

1/ LA SOURCE ENZYMATIQUE - LA TEMPERATURE -

a) La source enzymatique.

Elle est apportée par les corps axillaires congelés*et découpés manuellement. Nous n'avons effectué aucun essai d'isolement ou de purification de l'enzyme. Ce matériel congelé nous a semblé très utilisable pour les études enzymatiques; en effet, le tissu chromaffine de la Roussette synthétise à partir de la noradrénaline

soit 0,83 μ g d'adrénaline/mg de tissu frais/h

soit 0,60 μ g d'adrénaline/mg de tissu congelé/h.

(Peyrin, résultats non publiés).

b) La température d'incubation.

Nous n'avons pas étudié son influence sur l'activité de la dopamine β oxydase. Cependant, le choix de la température, que nous avons fixée a priori à 30°, a résulté de l'étude de la température optimale de la PNMT qui est de 30° pour ce tissu chromaffine.

2/ LES BLANCS D'INCUBATION -

Ils sont constitués d'une préparation tissulaire portée à ébullition pendant 10 mn à 100° et diluée dans 0,05 ml de TCA à 6 p.100. Nous pensons avoir ainsi dénaturé l'enzyme.

Les conclusions et l'interprétation que nous pouvons tirer des résultats obtenus par l'analyse de la dopamine ^{14}C (contenue dans un milieu sans enzyme et sans cofacteur) et par les blancs d'incubation sont les suivantes :

- le substrat ^{14}C , décongelé extemporanément, présente, à lui seul, une "impureté Y" dont les caractéristiques d'extraction sur Amberlite CG 50 et de chromatographie sur papier correspondent à celles de la noradrénaline.

- des cycles successifs de congélation à -20°C et de décongélation, exposant la dopamine ^{14}C de façon répétée à l'oxygène de l'air, augmentent le pourcentage de "l'impureté Y" par rapport à la radioactivité totale (de 0,10 à 0,60 p.100).

- "l'impureté Y" se reforme spontanément à partir de la dopamine ^{14}C , même après purification de cette dernière (tableau XIV).

* Roussettes congelées depuis 2 à 8 jours

- l'addition de cofacteurs au milieu, semble entraîner une augmentation du pourcentage de "Y" (0,09 à 0,85 p.100) (tableau XIV).

- le pH du milieu d'incubation est sans effet sur la variation de formation du pourcentage de "Y" (tableau XIV).

- l'augmentation de la température de +4° à +20°C entraîne une nette augmentation du pourcentage de "l'impureté Y".

Il est possible de stabiliser le pourcentage de "l'impureté Y" aux environs de 0,85 p.100 lorsque l'étape d'extraction sur Amberlite CG 50, après incubation, s'effectue à +4°C.

Or, la plupart des réactions chimiques sont influencées par la température.

Tous ces résultats nous permettent de penser que "l'impureté Y" est, en fait, de la noradrénaline formée à partir de la dopamine ^{14}C par voie chimique non enzymatique.

Cette hydroxylation chimique serait de nature radicalaire, possible grâce à la grande labilité du carbone benzylique en α du cycle; elle s'accompagnerait de la libération d'un peroxyde dans le milieu. L'autohydroxylation de la dopamine, par voie non enzymatique, a été mentionnée par Levin et Kaufman (1961).

Cependant, l'activité enzymatique de la dopamine β oxydase de la médullosurrénale de Boeuf étant bien supérieure à celle que nous avons trouvée pour le tissu chromaffine de la Roussette, le problème du substrat et les valeurs des blancs incubation n'ont pas été mentionnés avec précision par les auteurs.

3/ VALIDITE DES RESULTATS -

a) Le comptage des molécules radioactives.

Il a été soumis à des conditions expérimentales rigoureuses :

- tous nos comptages ont été effectués sur une prise d'éluat de 0,5 ml diluée dans 10 ml de mélange Triton-Herberg.

- le comptage des fractions radioactives contenant la noradrénaline ^{14}C s'effectue deux fois sur trois prises de 0,5 ml d'un même éluat. La précision des mesures est de 9 p.100.

- pour chaque série d'expériences, nous établissons la courbe du rendement de comptage en fonction du rapport B/C, permettant de corriger l'activité lue en coup par minute (cpm) en activité en désintégrations par minute (dpm).

b) Les incubations.

Pour un même lot de tissu chromaffine, traité le même jour et dans les mêmes conditions expérimentales, la dispersion des résultats varie entre 3 et 10 p.100.

La reproductibilité des essais n'a pas été étudiée de façon systématique. Deux résultats obtenus dans les mêmes conditions expérimentales à un mois et demi d'intervalle ont donné 8,9 et 7,4 nanomoles de noradrénaline formée/h/100 mg, soit une différence de 17 p.100.

Enfin, dans des conditions expérimentales cependant différentes et à un mois d'intervalle, nous avons obtenu une diminution de l'activité enzymatique de 71 p.100 et de 73,5 p.100, soit le même ordre de grandeur lorsque le pH du milieu s'abaisse de 5,5 à 5.

c) Les calculs numériques.

Les modes d'expression des résultats, en pourcentage relatif de chaque pic élué par rapport à la radioactivité totale élue et en nanomoles de noradrénaline formées/h/100 mg de tissu, ne tiennent pas compte des rendements d'extraction (3ème Partie, chapitre III, § I).

Ils permettent donc de déduire les valeurs obtenues pour les blancs incubation de celles obtenues pour les expériences d'incubation vraie.

4/ ARGUMENTS APPORTES EN FAVEUR DE LA PRESENCE D'UN SYSTEME ENZYMATIQUE HYDROXYLANT LA DOPAMINE EN NORADRENALINE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE -

Au cours de notre expérimentation, nous avons obtenu de la noradrénaline¹⁴ C. En fait, la transformation de la dopamine en noradrénaline peut être réalisée de deux façons :

- 1'une purement chimique, sans support tissulaire,
- 1'autre, enzymatique, nécessitant la dopamine β oxydase du tissu.

Notre problème est de savoir si la noradrénaline néoformée au cours de nos expériences d'incubation provient de la transformation enzymatique du substrat

dopamine ^{14}C dans le tissu chromaffine. Un certain nombre d'arguments expérimentaux nous permettent d'affirmer l'existence de cette transformation enzymatique.

- Dans tous les cas, le pourcentage de noradrénaline formée par voie chimique (blanc) est inférieur à celui formé en présence de la préparation tissulaire et des cofacteurs. (Fig. 28).

Il y a donc un effet propre dû à l'addition de l'extrait tissulaire; l'hydroxylation de la dopamine est accentuée sous l'action d'un système enzymatique contenu dans le tissu chromaffine.

- Des séries d'expériences, négatives quant au rendement de noradrénaline formée, peuvent cependant apporter des arguments en faveur de la présence d'un système d'hydroxylation enzymatique de la dopamine.

Ainsi, nous avons ajouté 10 μmoles de sulfate de cuivre à 1 ml du milieu d'incubation, destinées à inactiver les inhibiteurs endogènes éventuels contenus dans l'homogénat total : la formation de noradrénaline est inhibée à 100 p.100 dans ces conditions. L'effet de cet excès de cuivre se rapproche de l'inhibition enzymatique par excès de substrat. Cu^{++} constitue un premier substrat pour la dopamine β oxydase du Mammifère et son action inhibitrice vis à vis des préparations enzymatiques du tissu chromaffine de la Roussette peut être due à l'existence d'une enzyme catalysant la formation de la noradrénaline à partir de la dopamine dans ce tissu.

L'ensemble de ces résultats nous permet de penser que l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline dans le tissu chromaffine de la Roussette est sous la dépendance d'un système enzymatique.

5/ INTERPRETATION DES EFFETS DES DIFFERENTS PARAMETRES ETUDIES -

a) Catalase.

Nous avons trouvé que, à pH 5,5, la catalase augmente le pourcentage de formation de la noradrénaline de 180 p.100.

Cet effet de la catalase est certainement dû à la protection de l'enzyme vis à vis de l'eau oxygénée qui se forme dans le milieu au cours de la réaction. En effet, l'hydroxylation de la dopamine en noradrénaline en présence de l'enzyme purifiée de la médullosurrénale de Boeuf est inhibée à 90 p.100 lorsque le milieu d'incubation (1 ml) contient 0,1 μmole d'eau oxygénée (Levin et Kaufman, 1961)

b) La N éthylmaleimide.

La N éthylmaleimide, ajouté directement au milieu, ou en préincubation 10 mn avec l'ATP, augmente l'activité enzymatique. Pour 4,5 mg de tissu, 4 μ moles de N éthylmaleimide augmentent la quantité de noradrénaline formée de 2,3 à 8,9 nanomoles/h/100mg. Cette augmentation est significative.

L'effet de la N éthylmaleimide est difficile à interpréter car, dans le tissu chromaffine de la Roussette, nous ne connaissons pas sous quelle forme se trouve l'enzyme d'hydroxylation, quelle est sa localisation intracellulaire, dans quel compartiment cellulaire il est situé lorsque le tissu est soumis à un fin découpage manuel.

En comparant les effets de la N éthylmaleimide sur la dopamine β oxydase de la médullosurrénale de Boeuf (1ère Partie) et l'action de ce composé sur le tissu chromaffine de Roussette, nous pouvons émettre deux hypothèses :

- ou bien la localisation intracellulaire de la dopamine β oxydase est, comme chez le Mammifère intragranulaire (ou dans une structure identique au granule),

- ou bien des inhibiteurs endogènes de la dopamine β oxydase sont présents dans le compartiment cellulaire où se trouve l'enzyme.

Enfin ces deux hypothèses peuvent être valables simultanément.

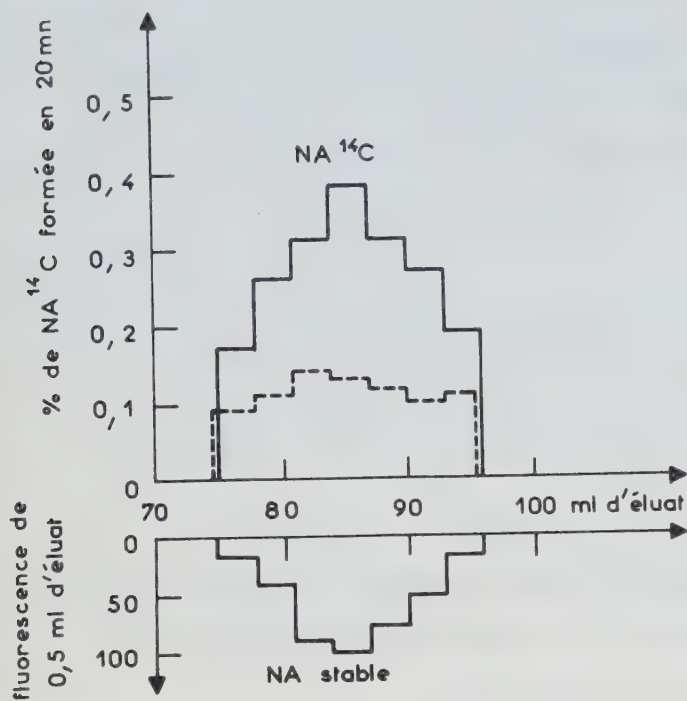
c) L'augmentation de la quantité de tissu.

Nous avons obtenu une diminution de l'activité enzymatique, en présence de 4 μ moles de N éthylmaleimide et de 10 nanomoles de dopamine ^{14}C , lorsque la quantité totale de l'extrait tissulaire passe de 4,5 à 7,7 et 8,7 mg.

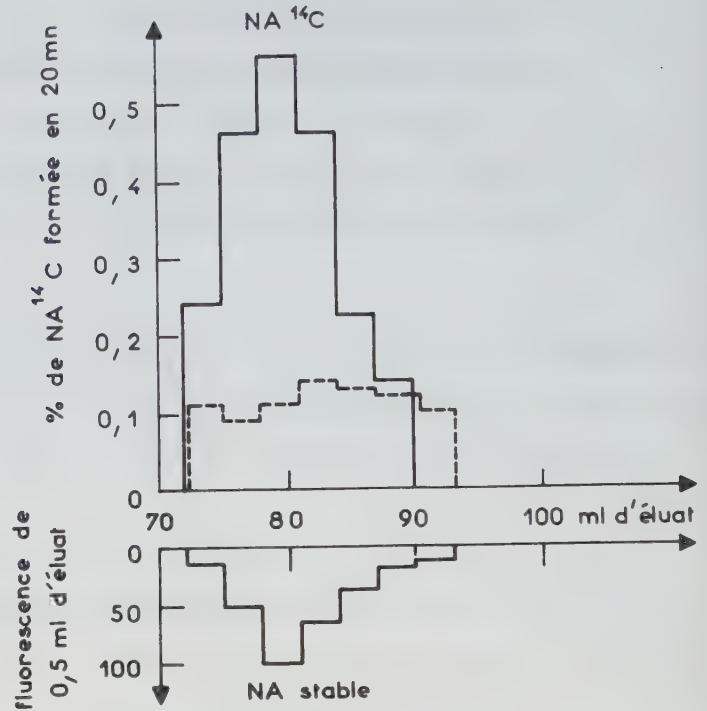
Le substrat ne peut pas être considéré comme un facteur limitant car nous aurions obtenu une formation de noradrénaline ^{14}C constante pour ces trois quantités tissulaires croissantes.

Il est possible d'interpréter ces résultats en tenant compte du fait que l'augmentation tissulaire conduit non seulement à une élévation de la concentration de l'enzyme mais aussi à celle des différents composés présents dans le tissu pouvant être, en particulier, des inhibiteurs de l'enzyme. Il se peut ainsi que la quantité de N éthylmaleimide (4 μ moles) soit insuffisante pour inactiver les inhibiteurs apportés par des quantités croissantes de tissu.

Fig. 28 - Formation de noradrénaline ^{14}C dans les blancs d'incubation (---)

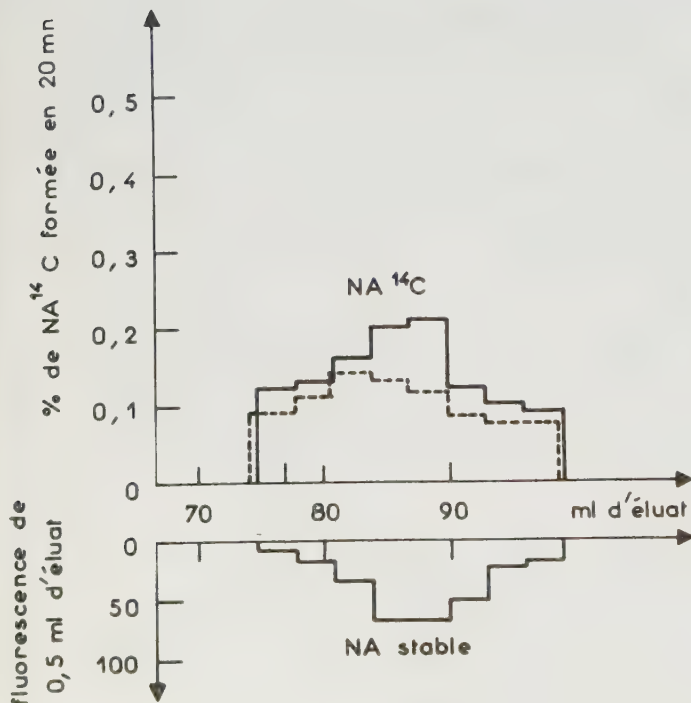


a



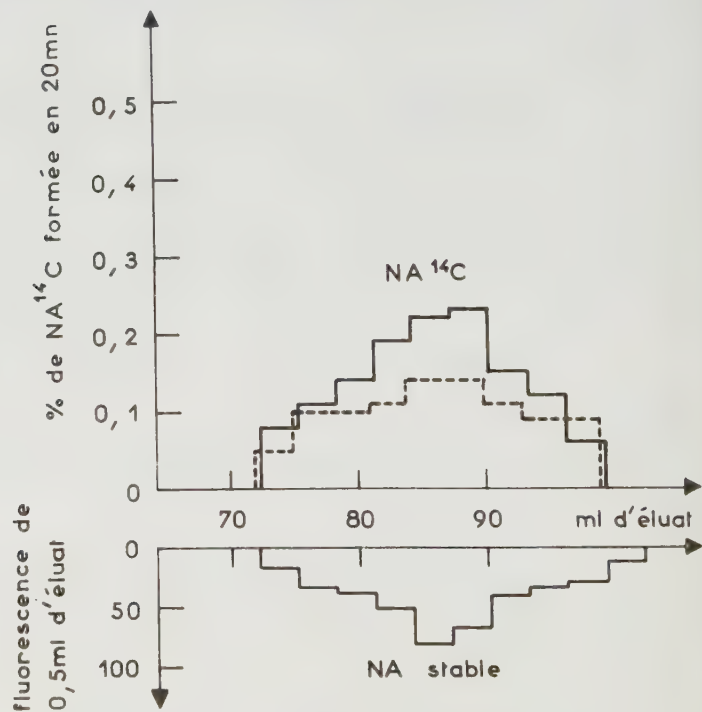
b

a et b: tissu 4,5 mg; Dopamine ^{14}C = 10 nanomoles; acétate d'ammonium 200 μmoles ; acide ascorbique 6 μmoles ; acide fumarique 10 μmoles ; ATP = 10 μmoles ; catalase = 100 unités; NEM = 4 μmoles NaOH 0,5 M et eau q.s.p; pH 5,5 l m



c

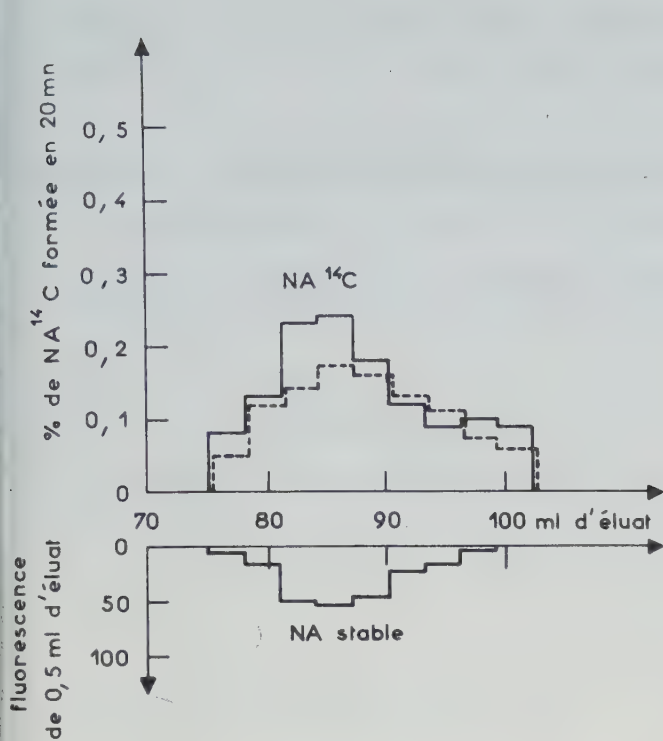
conditions d'incubation identiques à a et b mais pH du milieu = 5



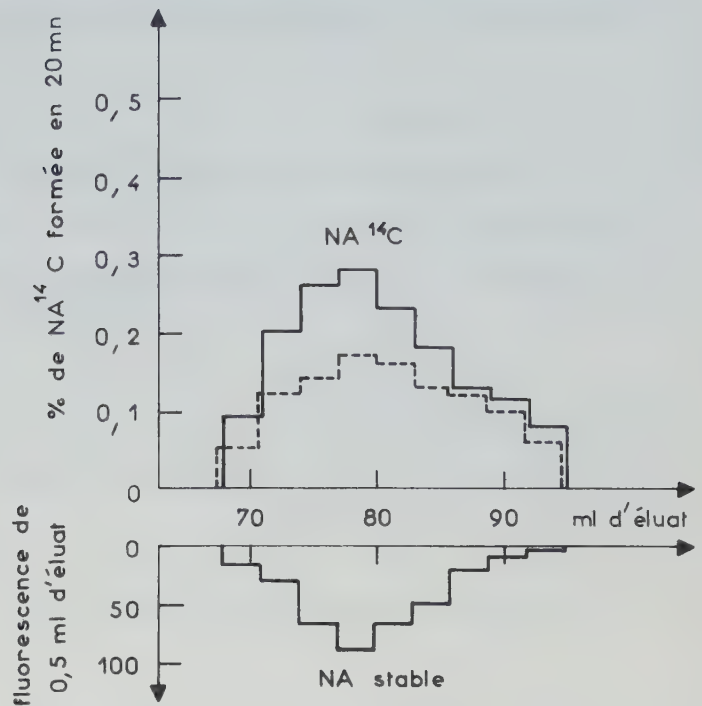
d

conditions d'incubation identiques à a et b mais 8,7 mg de tissu

et dans les incubations enzymatiques (—)

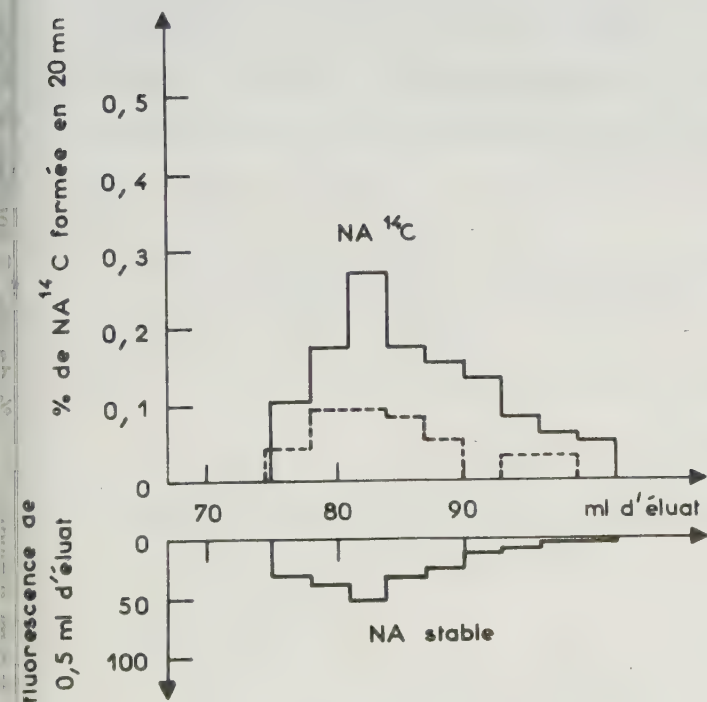


e



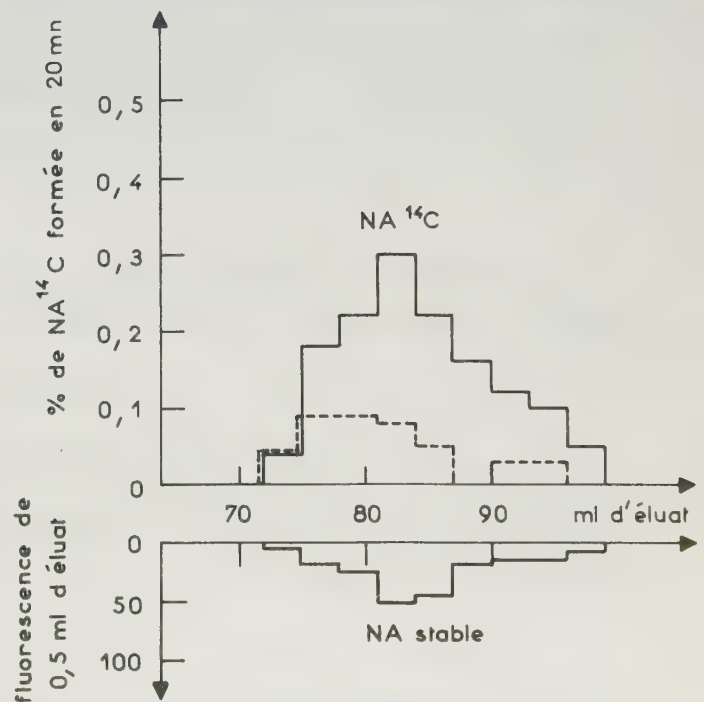
f

e et f conditions d'incubation identiques à a et b mais 7,7 mg de tissu



g

g : conditions identiques à a et b
mais tissu 4,4 mg et NEM 4 μ moles
en préincubation



h

h : conditions d'incubation identiques à g
mais NEM = 10 μ moles en préincubation

Cette hypothèse devra être vérifiée par variation parallèle de la quantité de tissu et de la concentration en N éthylmaleimide.

d) Le pH.

Les résultats permettant de penser que le pH optimum de la réaction enzymatique se situe dans une zone voisine de pH 5,5 demandent à être vérifiés systématiquement en maintenant constants tous les autres paramètres du milieu.

Cette valeur peut difficilement être comparée à celle de l'enzyme de la glande médullosurrénale du Mammifère. En effet, elle dépend du mode de préparation de l'enzyme (extrait total, enzyme dans le granule, fraction granulaire lysée) et varie entre pH 7,5 et 5,5 (1ère Partie).

6/ VALEURS DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE -

La valeur maxima que nous avons obtenue en présence de N éthylmaleimide (4 μ moles et 10 μ moles) est de 8,9 et 9,2 nmoles de noradrénaline formée/h/100 mg de tissu congelé.

La comparaison avec l'enzyme dopamine β oxydase de la médullosurrénale de Mammifère est limitée dans la mesure où peu de résultats concernent l'activité de l'enzyme contenue dans un homogénat total.

NAGATSU et al. (1967) ont obtenu pour un homogénat total de 4,1 mg de médullosurrénale de Boeuf en présence de 2,3 μ moles de N éthylmaleimide, la formation de 2,06 μ moles de noradrénaline/h/100 mg.

Les valeurs sont beaucoup moins élevées pour la glande médullosurrénale du Lapin et du Rat (Viveros et al., 1969b) :

- 6,9 nanomoles d'octopamine/h/100 mg pour le Lapin
- 1,2 nanomoles d'octopamine/h/glande pour le Rat

Elles sont donc du même ordre de grandeur que celles obtenues pour le tissu chromaffine de la Roussette.

L'enzyme de méthylation du tissu chromaffine de la Roussette peut former 83 μ g d'adrénaline/h/100 mg soit 453 nanomoles/h/100 mg (Peyrin, 1967) alors que seulement en moyenne 9 nanomoles de noradrénaline/h/100 mg de tissu peuvent être hydroxylées à partir de la dopamine.

Le rapport de l'activité PNMT (Wurtman et al., 1967) et dopamine β oxydase (Viveros et al., 1969b) obtenu dans la glande m dulosurr nale de Rat est nettement plus élevé que celui obtenu chez la Roussette:

$$\text{Rat : } \frac{\text{Adrénaline/h/100 mg de tissu}}{\text{Octopamine/h/100 mg de tissu}} = \frac{11,2 \text{ nanomoles}}{2,4 \text{ nanomoles}} = 4,6$$

$$\text{Roussette : } \frac{\text{Adrénaline/h/100 mg de tissu}}{\text{Dopamine /h/100 mg de tissu}} = \frac{453 \text{ nanomoles}}{9 \text{ nanomoles}} = 50,3$$

L'activité dopamine β oxydase que nous avons trouvée semblerait donc particulièrement faible si cependant un parallèle peut être établi pour des classes animales aussi éloignées. Cette valeur ne constitue, en fait, qu'un premier résultat obtenu dans certaines conditions expérimentales qui ne sont peut être pas les conditions optimales.

7/ LIMITE DE NOTRE ETUDE -

Nous ne sommes pas certains que la noradrénaline ^{14}C , formée par voie enzymatique, soit le seul produit de transformation de la dopamine ^{14}C ajoutée au tissu.

En effet, dans la m dulosurr nale de Boeuf, Laduron a montré très récemment (1972) que la dopamine peut se transformer en épinine, dérivé N méthylé de la dopamine. La PNMT, en présence de S adénosylméthionine, catalyse cette réaction. La présence de cette enzyme a été démontrée chez la Roussette dont le tissu chromaffine peut méthylé la noradrénaline même sans apport exogène de cofacteurs : l'ATP et la méthionine suffisent en partie.

Or, l'ATP est l'un des cofacteurs ajoutés à nos milieux d'incubation et nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité de la méthylation de la dopamine en épinine, et, dont notre technique n'aurait pas révélé l'existence.

Cependant, les rendements en ^{14}C de nos expériences d'extraction sont bons (entre 75 et 98 p.100), ce qui permettrait d'exclure, en partie, la présence d'un autre composé présent dans le milieu après incubation mais non extrait sur Amberlite CG 50.

Le contrôle de l'extraction de l'épinine pure est indispensable pour infirmer ou affirmer cette hypothèse.

CONCLUSION

L'étude de la dopamine dans le tissu chromaffine de la Roussette (*Scyliorhinus canicula*) a été abordée sous deux aspects :

- l'analyse du contenu en dopamine du tissu chromaffine
- la mise en évidence de la transformation de la dopamine en noradrénaline dans ce tissu.

La 1ère partie de cette étude a nécessité la mise au point d'une technique d'extraction et de dosage de la dopamine tissulaire, devant répondre à l'exigence de séparer rigoureusement la dopamine des autres catécholamines. Le tissu chromaffine (corps axillaires et corps suprarénaux) a été extrait, sans déprotéinisation, sur Amberlite CG 50 et élué par fractions successives de 3 ml avec l'acétate d'ammonium 0,4 M pH 4,7. Nous avons pu suivre la séparation totale de la dopamine, du bloc noradrénaline-adrénaline (3 ml) et constater qu'elle était reproductible. L'emploi de cette technique, qui nous a permis d'extraire la dopamine avec un rendement de 90 p.100 et de la doser avec une sensibilité de 10 ng/1,4 ml de prise d'essai, a donné les résultats suivants :

pour les corps suprarénaux femelles : $0,114 \pm 0,017$ μg de OHT soit $0,85\% \pm 0,09$
par rapport à la concentration totale en
catécholamines

pour les corps suprarénaux mâles : $0,068 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,017$ soit $0,75\% \pm 0,08$

pour les corps axillaires mâles : $0,052 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,000$ soit $0,51\% \pm 0,06$

Les corps suprarénaux femelles sont significativement ($p < 0,05$) plus riches en dopamine que les corps suprarénaux mâles. Le pourcentage de dopamine est, en moyenne, du même ordre de grandeur que celui de la glande médullosurrénale des Mammifères.

La spécificité de notre technique permet d'affirmer que le composé analysé est de la dopamine.

Nous pouvons conclure que la dopamine est un constituant normal du tissu chromaffine de la Roussette.

La deuxième partie de cette étude concerne la mise en évidence de la transformation de la dopamine en noradrénaline dans le tissu chromaffine de la Roussette. Elle a été conduite, *in vitro*, par incubation des corps axillaires en présence de substrat dopamine ^{14}C et de cofacteurs, sans essai d'isolement ou de purification de l'enzyme. Nous avons séparé le produit de la réaction ^{14}C néoformé du substrat ^{14}C par chromatographie sur Amberlite CG 50 et, de même que pour l'analyse fluorimétrique des éluats d'extraits tissulaires, nous avons pu contrôler, par comptage des fractions radioactives en scintillation liquide, la séparation de la dopamine ^{14}C et de la noradrénaline ^{14}C .

Les problèmes posés par la dégradation de la dopamine ^{14}C , entraînant la formation de noradrénaline ^{14}C par un mécanisme radicalaire de nature purement chimique, ont pu être en partie résolus en purifiant le substrat ^{14}C , en ne le décongelant extemporanément et qu'une seule fois, enfin en conduisant les étapes d'extraction du milieu d'incubation sur Amberlite CG 50 à $+ 4^{\circ}\text{C}$.

Les résultats obtenus dans ces conditions nous ont montré que, dans tous les cas, le pourcentage de noradrénaline ^{14}C formée en présence du tissu chromaffine est supérieur à celui formé en absence de tissu (blanc d'incubation).

Ces résultats nous permettent de conclure que l'apport du tissu chromaffine favorise la formation de noradrénaline ^{14}C à partir de dopamine ^{14}C .

Le tissu chromaffine contient donc un système enzymatique permettant d'hydroxyler la dopamine en noradrénaline.

Au point de vue quantitatif nous avons obtenu, dans les conditions optimales d'incubation, la formation de 9 nanomoles de noradrénaline $^{14}\text{C}/\text{h}/100 \text{ mg}$ de tissu congelé (1,4 p.100 de la radioactivité totale élue) soit le même ordre de grandeur que la valeur trouvée pour la glande médullosurrénale de Lapin (6,9 nanomoles d'octopamine/h/100 mg) (Viveros et al., 1969b).

Nos résultats semblent montrer que :

- le pH optimum de l'enzyme contenue dans l'homogénat total est voisin de 5,5
- la N éthylmaléimide augmente le rendement de formation de la noradrénaline
- l'augmentation tissulaire diminue au contraire le rendement de formation de la noradrénaline.

Toutefois, ces premiers résultats ne peuvent pas apporter de connaissances précises sur la dopamine β oxydase du tissu chromaffine de la Roussette car beaucoup d'inconnues subsistent en ce qui concerne l'étude de cette enzyme :

- quelle valeur faut-il attribuer au tissu congelé pour l'étude de la dopamine β oxydase ?

- quelles sont les conditions optimales de la réaction enzymatique ?

- a-t-on assuré une bonne accessibilité du site enzymatique vis à vis du substrat ? quelle est la localisation intracellulaire de l'enzyme ?

- y a-t-il, comme dans l'homogénat total de la glande médullosurrénale de Boeuf, des inhibiteurs cytoplasmiques naturels de l'enzyme comme pourraient le faire penser nos résultats obtenus en présence de N éthylmaleimide.

Il faut souligner la complexité de l'étude de l'enzyme dopamine β oxydase. La transformation de la dopamine en noradrénaline passe par plusieurs complexes E-S intermédiaires et les conditions expérimentales doivent être parfaitement définies pour entraîner la formation du produit final de la réaction. En outre, dans la glande médullosurrénale de Mammifère en particulier, l'enzyme est sous une forme latente dans le granule chromaffine et la présence d'inhibiteurs cytoplasmiques endogènes rend l'étude de la réaction d'hydroxylation complexe lorsque l'on travaille sur un homogénat total.

Au terme de ce travail, nous pouvons conclure que la dopamine est un constituant normal du tissu chromaffine de la Roussette *Scyliorhinus canicula* et, que, dans ce tissu, elle peut s'hydroxyler en noradrénaline sous l'action d'un système enzymatique. Cette amine constitue donc l'un des précurseurs de la noradrénaline présente.

Au point de vue phylogénique, nous avons renforcé les analogies biochimiques déjà existantes en ce qui concerne la noradrénaline et l'adrénaline entre la glande médullosurrénale du Mammifère et le tissu chromaffine de la Roussette. Nous n'excluons cependant pas la possibilité que l'octopamine ou la dihydroxyphénylsérine puissent être également contenues dans le tissu chromaffine de la Roussette et précurseurs de la noradrénaline ou que ce tissu puisse réaliser la transformation enzymatique de la dopamine en épinine.

BIBLIOGRAPHIE

- ANTON A.H. et SAYRE D.F. (1964) -
The distribution of dopamine and DOPA in various animals and a method for their determination in diverse biological material.
J. of Pharmacol., 145, 326
- ARIËNS E.J. (1963) -
Steric structure and activity of catecholamines on α and β receptors.
Proceed. first Internat. Pharmacol. Meeting, 7, 247
- AXELROD J. (1962a) -
The enzymatic N methylation of serotonin and other amines.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 138, 28
- AXELROD J. (1962b) -
Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyltransferase.
J. Biol. Chem., 237, 1657
- BALZER H. et HOLTZ P. (1956) -
Beeinflussung der Wirkung biogener Amine durch Hemmung der Aminooxydase.
Arch. Exp. Path. Pharmacol., 227, 547
- BANKS P. et HELLE K.B. (1971) -
Chromogranins in sympathetic nerves.
Phil. Trans. Roy. Soc. London, 261, 305
- BELPAIRE F. et LADURON P. (1968) -
Tissue fractionation and catecholamines. I - Latency and activation properties of dopamine β hydroxylase in adrenal medulla.
Bioch. Pharmacol., 17, 411
- BELPAIRE F. et LADURON P. (1970) -
Tissue fractionation and catecholamines. III - Intracellular distribution of endogenous inhibition of dopamine β hydroxylase in adrenal medulla.
Bioch. Pharmacol., 19, 1323
- BERTLER A., CARLSSON A. et ROSENGREN E. (1958) -
A method for the fluorimetric determination of adrenaline and noradrenaline in tissues.
Acta Physiol. Scand., 44, 273
- BERTLER A., HILLARPS N.A. et ROSENGREN E. (1960) -
Storage of new-formed catecholamines in the adrenal medulla.
Experientia (Basel), 16, 419
- BERTLER A. et ROSENGREN E. (1959a) -
Occurrence and distribution of catecholamines in brain.
Acta Physiol. Scand., 47, 350
- BERTLER A. et ROSENGREN E. (1959b) -
Brain catecholamine content after sectioning the adrenergic nerves to the brain vessels.
Acta Physiol. Scand., 47, 362
- BERTLER A. et ROSENGREN E. (1959c) -
Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues.
Experientia, 15, 10

- BISCARDI A.M. et DONOSO A.O. (1967) -
Biosynthesis of catecholamines by adrenal chromaffin tissue in snakes.
Life Sciences, 6, 79
- BJÖRKLUND A., FALCK B. et KLEMM N. (1970) -
Microspectrofluorimetric and chemical investigation of catecholamine-containing
structures in the thoracic ganglia of Trichoptera.
J. Insect. Physiol., 16, 1147
- BLASCHKO H., SMITH A.D. et WINKLER H. (1965) -
Lysosomal enzymes and chromaffin granules.
Biochem. J., 196, 49P
- BLOOM G., ÖSTLUND E., Von EULER U.S., LISHAJKO F., RITZEN M. et ADAMS-RAY J. (1961) -
Studies on catecholamine-containing granules of specific cells in cyclostome
hearts.
Acta Physiol. Scand., 53, suppl. 185
- BOHUON C. et GUERINOT F. (1968) -
Dopamine hydroxylase humaine et bovine. Activité vis à vis de la dopamine
et de la méthoxytyramine.
Clin. Chim. Acta, 19, 125
- BRIDGERS W.F. et KAUFMAN S. (1962) -
The enzymatic conversion of epinine to epinephrine.
J. Biol. Chem., 237, 526
- BURACK W.R. et BADGER A. (1964) -
Sequential appearance of DOPA decarboxylase, dopamine β oxidase and norepi-
nephrine-N-methyltransferase activities in embryonic chick.
Fed. Proceed., 24, 561
- BURN J.H. et RAND M.J. (1958) -
The depressor action of dopamine and adrenaline.
Brit. J. Pharmacol., 13, 471
- CALLINGHAM B.A. et SHARMAN D.F. (1970) -
The concentration of catecholamines in the brain of the domestic fowl.
Brit. J. Pharmacol., 40, 1
- CARDOT J. (1963) -
Sur la présence de la dopamine dans le système nerveux et ses relations
avec la décarboxylation de la dihydroxyphénylalanine chez le Mollusque *Helix*
pomatia.
C.R. Acad. Sci. Paris, 257, 1364
- CARLSSON A. et WALDECK B. (1958) -
A fluorimetric method for the determination of dopamine.
Acta Physiol. Scand., 44, 293
- CARLYLE R.F. (1969) -
The occurrence of catecholamines in the sea anemone *Actina equina*.
Brit. J. Pharmacol., 36, 182
- CORRODI H. et JONSSON G. (1967) -
The formaldehyde fluorescence method for the histochemical demonstration
of biogenic monoamines.
J. Histochem. Cytochem., 15, 65
- COTTRELL G.A. (1967) -
Occurrence of dopamine and noradrenaline in the nervous tissue of some
invertebrate species.
Brit. J. Pharmacol. Chemotherap., 29, 63

- CREVELING C.R., DALY J.W., WITKOP B. et UDENFRIEND S. (1962a) -
Substrates and inhibitors of dopamine β oxidase.
Biochem. Biophys. Acta, 64, 125
- CREVELING C.R., LEVITT M. et UDENFRIEND S. (1962b) -
An alternative route for biosynthesis of norepinephrine
Life Sciences, 10, 523
- DAHL E., EHINGER B., FALCK B., Von MECKLENBURG C., MYHRBERG H. et ROSENGREN E. (1971) -
On the monoamine storing cells in the heart of *Lampruca fluviatilis* and *L. planeri* (Cyclostomata).
Gen. and Compar. Endocrinol., 17, n° 2, 241
- DAHL E., FALCK B., Von MERCKLENBURG C. et MYHRBERG H. (1963) -
An adrenergic nervous system in sea anemones.
Q. J. Microsc. Sci., 104, 531
- DEMIS D.J., BLASCHKO H. et WELCH A.D. (1955) -
The conversion of dihydroxyphenylalanine 2 ^{14}C (DOPA) to norepinephrine by
bovine adrenal medullary homogenates.
J. Pharm. Exp. Therap., 113, 14
- DENGLER H. (1957) -
Über das Vorkommen von Oxytyramin in der Nebenniere.
Arch. Exp. Path. Pharmacol., 231, 373
- DRUJAN B.D., SOURKES T.L., LAYNE D.S. et MURPHY G.F. (1959) -
The differential determination of catecholamines in urine.
Canad. J. Biochem. Physiol., 37, 1153
- DUCH D.S., VIVEROS O.H. et KIRSHNER N. (1967) -
Endogenous inhibitor(s) in adrenal medulla of dopamine β oxidase.
Biochem. Pharmacol., 17, 255
- DULIERE W.L. et RAPER H.S. (1930) -
The tyrosinase-tyrosine reaction. The action of tyrosinase on certain substances
related to tyrosine.
Biochem. J., 24, 239
- EADE N.R. (1958) -
The distribution of the catecholamines in homogenates of the bovine adrenal
medulla.
J. Physiol. (London), 141, 183
- EHINGER B. et MYHRBERG H.E. (1971) -
Neuronal localization of dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in
the central and peripheral nervous system of *Lumbricus terrestris*.
Histochemie, 28, 265
- EHRINGER H. et HORNYKIEWICZ O. (1960) -
Verteilung von Noradrenalin und Dopamin in Gehirn des Menschen und ihr Verhalten
bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems.
Klin. Wschr., 38, 1236
- ERSPAMER V. et BORETTI G. (1951) -
Identification and characterization by paper chromatography of enteramine,
octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior
salivary glands of Octopoda and the tissue extracts of vertebrates and inver-
tebrates.
Arch. Intern. Pharmacodyn. Therap., 87, 296
- EULER U.S. Von (1953) -
Presence of catecholamines in visceral organs of Fish and Invertebrates.
Acta Physiol. Scand., 28, suppl. 101

- EULER U.S. Von et FANGE R. (1961) -
Catecholamines in nerves and organs of myxine glutinosa, Squalus acanthias,
Gadus callaris.
Gen. Comp. Endocrinol., 1, 191
- EULER U.S. Von, HAMBERG U. et HELLNER S. (1951) -
 β -(3-4 dihydroxyphenyl) ethylamine (hydroxytyramine) in normal human urine.
Biochem. J., 49, 655
- EULER U.S. Von et LISHAJKO F. (1957) -
Dopamine in mammalian lung and spleen.
Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., 6, 295
- FALCK B., HÄGGENDAL J. et OWMAN C. (1963) -
The localization of adrenaline in adrenergic nerves in the frog.
Quar. J. Exptl. Physiol., 253, 257
- FLEMING R.M., CLARK W.G., FENSTER E.D. et TOWNE J.C. (1965) -
Single extraction method for the simultaneous fluorometric determination of
serotonin, dopamine and norepinephrine in brain.
Analytical Chem., 37, 692
- FRIEDMAN S. et KAUFMAN S. (1965a) -
3-4 dihydroxyphenylethylamine β hydroxylase : a copper protein.
J. Biol. Chem., 240, n° 1, PC 552
- FRIEDMAN S. et KAUFMAN S. (1965b) -
3-4 dihydroxyphenylethylamine β hydroxylase.
J. Biol. Chem., 240, n° 12, 4763
- FRONTALI N. et HÄGGENDAL J. (1969) -
Noradrenaline and dopamine content in the brain of the cockroach Periplaneta
americana.
Brain Res., 14, 540
- GERARDY J., QUINAUX N. et DRESSE A. (1971) -
Dosage de la noradrénaline, de la dopamine et de l'acide dihydroxyphényl-
acétique dans certains noyaux du cerveau de rat.
Experientia, 27, 112
- GERSCHENFELD H.M. (1964) -
A non-cholinergic synaptic inhibition in the central nervous system of a
mollusc.
Nature (London), 203, 415
- GLOWINSKI J., IVERSEN L.L. et AXELROD J. (1967) -
Regional distribution and metabolism of H^3 norepinephrine and H^3 dopamine in the
rat brain.
The Pharmacologist, 7, n° 2, 20ème série
- GOLDBERG L.I. (1970) -
Renal vasodilating actions of dopamine. L DOPA and parkinsonism.
Editions Barbeau p. 305, F.A. DAVIS Company
- GOLDSTEIN M., ANAGNOSTE B. et LAUBER E. (1964a) -
Inhibition of dopamine β hydroxylase by disulfiram.
Life Sciences, 3, 763
- GOLDSTEIN M. et CONTRERA J.F. (1962 a) -
The substrates specificity of phenylamine β hydroxylase.
J. Biol. Chem., 237, 1898
- GOLDSTEIN M. et CONTRERA J.F. (1962b) -
The activation and inhibition of phenylamine β hydroxylase.
Experientia, 18, 334

- GOLDSTEIN M., JOH T.H. et GARVEY T.Q. (1968) -
Kinetic studies of the enzymatic dopamine β hydroxylation reaction.
Biochemistry, 7, 2724
- GOLDSTEIN M., LAUBER E. et Mc KERECHAN M.R. (1964b) -
The inhibition of dopamine β hydroxylase by tropolone and other chelating agents
Biochem. Pharmacol., 13, 1103
- GOLDSTEIN M., LAUBER E. et Mc KERECHAN M.R. (1965) -
Studies on the purification and characterization of 3-4 dihydroxyphenylethylamine β hydroxylase.
J. Biol. Chem., 240, 2066
- GOODALL Mc C. (1951) -
Studies of adrenaline and noradrenaline in mammalian hearts and suprarenals
Acta Physiol. Scand., 24, suppl. 85
- GOODALL Mc C. et KIRSHNER N. (1957) -
Biosynthesis of adrenaline and noradrenaline in vitro.
J. Biol. Chem., 226, 213
- HAGEN P. (1956) -
Biosynthesis of norepinephrine from 3-4 dihydroxyphenylethylamine (dopamine).
J. Pharm. Exp. Therap., 116, 26
- HÄGGENDAL J. (1962) -
On the use of strong exchange resins for determination of small amounts of catecholamines.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 14, 537
- HÄKANSON R., LUNDQUIST I. et RERUP C. (1967) -
On the hyperglycaemic effect of DOPA and dopamine.
Europ. J. Pharmacol., 1, 114
- HARLEY , MASON J. et LAIRD A.H. (1958) -
Isolation and structure of the fluorescent compound formed from adrenaline and ethylene diamine.
Biochem. J., 69, 59
- HILLARP N.A. (1959) -
Further observations on the state of the catecholamines stored in the adrenal medullary granules.
Acta Physiol. Scand., 47, 271
- HILLARP N.A. et NILSON B. (1954) -
The structure of the adrenaline and noradrenaline containing granules in the adrenal medullary cells with reference to the storage and release of the sympathomimetic amines.
Acta Physiol. Scand., 31, suppl. 113
- HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H. (1953) -
A chromatographic investigation of pancreatic ribonuclease.
J. Biol. Chem., 200, 493
- HOLTZ P., HEISE R. et LÜDTKE K. (1939) -
Fermentativer Abbau L-dihydroxyphenylalanin durch Niere.
Arch. Exp. Path. Pharmacol., 191, 87
- HOLTZ P., STOCK K. et WESTERMANN E. (1963) -
Über die Blutdruckwirkung des Dopamins.
Arch. Exp. Path. Pharmacol., 246, 133
- HORNYKIEWICZ O. (1958) -
The action of dopamine on the arterial blood pressure of the guinea pig.
Brit. J. Pharmacol., 13, 91
- HORNYKIEWICZ O. (1966) -
Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function.
Pharmacol. Rev., 18, 925

- JONASON J. (1968) -
Metabolism of dopamine and noradrenaline in normal, atrophied and postglandionically sympathectomized Rat salivary glands in vitro.
Acta Physiol. Scand., 00, 000 (*Preprint*)
- JONSSON G. et SACHS C. (1970) -
Synthesis of noradrenaline from 3-4 dihydroxyphenylalanine (DOPA) and dopamine in adrenergic nerves of mouse atrium. Effect of reserpine, mono amine oxidase and tyrosine hydroxylase inhibition.
Acta Physiol. Scand., 80, 307
- KÄGI J., BURGER M. et GIGER K. (1957) -
Modifikationen Zur Fluorescenz methode von WEIL-MALHERBE und BONE zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin in menschlichen Blutplasma.
Arch. exp. Path., 230, 470
- KAKIMOTO Y. et ARMSTRONG M.D. (1962) -
On the identification of octopamine in mammals.
J. Biol. Chem., 237, 422
- KERKUT G.A., SEDDEN C.B. et WALKER R.J. (1966) -
The effect of DOPA, α -methyl DOPA and reserpine on the dopamine content of the brain of the snail *Helix aspersa*.
Comp. Biochem. Physiol., 18, 921
- KERKUT G.A. et WALKER G.J. (1962) -
The specific chemical sensitivity of *Helix* nerve cells.
Comp. Biochem. Physiol., 7, 277
- KIER L.B. et TRUITT E.B. Jr. (1970) -
The preferred conformation of dopamine from molecular orbital theory.
J. Pharmacol. exp. Therap., 174, 94
- KIRSHNER N. (1957) -
Pathway of noradrenaline formation from DOPA.
J. Biol. Chem., 226, 821
- KIRSHNER N. (1959) -
Formation of noradrenaline from 3-4 dihydroxyphenylethylamine.
Fed. Proceed., 18, 261
- KIRSHNER N. (1966) -
Second symposium on catecholamines.
G-Summary of discussion and commentary.
Pharmacol. Rev., 18, 83
- KIRSHNER N. et GOODALL Mc G. (1957) -
Separation of adrenaline, noradrenaline and hydroxytyramine by ion exchange chromatography.
J. Biol. Chem., 226, 207
- KIRSHNER N. et KIRSHNER A.G. (1971) -
Chromogranin A, dopamine β hydroxylase and secretion from the adrenal medulla.
Phil. Trans. Roy. Soc. London, 261, 279
- KLEMM N. et BJÖRKLUND A. (1971) -
Identification of dopamine and noradrenaline in nervous structures of the insect brain.
Brain Res., 26, 459
- LADURON P. (1972) -
N-methylation of dopamine to epinine in adrenal medulla : a new model for the biosynthesis of adrenaline.
Arch. intern. Pharmacol. Therap., 195, 197

- LADURON P. et BELPAIRE F. (1968) -
Tissue fractionation and catecholamines. II - Intracellular distribution
pattews of tyrosine hydroxylase, DOPA decarboxylase, dopamine hydroxylase,
phenylethanolamine N methyltransferase and monoamine oxidase in adrenal
medulla.
Biochem. Pharmacol., 17, 1127
- LAKE C.R., MILLS R.R. et BRUNET P.C.J. (1970) -
 β hydroxylation of tyramine by cockroach hemolymph.
Biochem. Biophys. Acta, 215, 226
- LAVERTY R. et SHARMAN D.F. (1965) -
The estimation of small quantities of 3-4 dihydroxyphenylethylamine in tissues.
Brit. J. Pharmacol., 24, 538
- LAVERTY R. et TAYLOR K.M. (1968) -
The fluorimetric assay of catecholamines and related compounds.
Analyt. Biochem., 22, 269
- LEMBERGER L., KUTZMAN R. et CONNEY A.H. (1963) -
Synthesis of dopamine from tyramine in vitro.
Fed. Proceed., 22, 388
- LEVIN E.Y. et KAUFMAN S. (1961) -
Studies on the enzyme catalyzing the conversion of 3-4 dihydroxyphenylethyl-
amine to norepinephrine.
J. Biol. Chem., 236, 2043
- LEVIN E.Y., LEVENBERG B. et KAUFMAN S. (1960) -
The enzymatic conversion of 3-4 dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine.
J. Biol. Chem., 235, 2080
- LISHAJKO F. (1968) -
Occurence and some properties of dopamine containing granules in the sheep
adrenal.
Acta Physiol. Scand., 72, 255
- LISHAJKO F. (1969) -
Release, reuptake and net uptake of dopamine, noradrenaline and adrenaline in
isolated sheep adrenal medullary granules.
Acta Physiol. Scand., 76, 159
- LISHAJKO F. (1970) -
Dopamine secretion from the isolated perfused sheep adrenal.
Acta Physiol. Scand., 79, 405
- LOVENBERG W., WEISSBACH H. et UDENFRIEND S. (1962) -
Aromatic L-aminoacid decarboxylase.
J. Biol. Chem., 237, 89
- Mc DONALD R.H. et GOLDBERG L.I. (1963) :-
Comparative effects of dopamine on renal and femoral blood flows.
The Pharmacologist, 5, 269
- Mc GEER E.G. et Mc GEER P.L. (1962) -
Catecholamine content of the spinal cord.
Canad. J. Biochem. Physiol., 40, 1141
- Mc GEER E.G., LING G.M. et Mc GEER P.L. (1963) -
Conversion of tyrosine to catecholamines by cat brain in vivo.
Biochem. Biophys. Res. Com., 13, 291

- Mc LENNAN H. (1965) -
The release of dopamine from the putamen.
Experientia, 21, 725
- Mc LENNAN H. (1970) -
The physiology of dopamine. L-DOPA and parkinsonism.
Editions Barbeau, p. 383
- Mc NAY J.L., Mc DONALD R.H. et GOLDBERG L.I. (1965) -
Direct renal vasodilatation produced by dopamine in the dog.
Circul. Res., 16, 510
- MÄRKI F., AXELROD J. et WITKOP B. (1962) -
Catecholamines and methyltransferases in the South American toad (*Bufo marinus*).
Biochem. Biophys. Acta, 58, 367
- MASUOKA D.T., DRELL W., SCHOTT H.F., ALCARAZ A.F. et JAMES E.C. (1963) -
Separation of catecholamines and their metabolites.
Analyt. Biochem., 5, 426
- MASUOKA D.T., SCHOTT H.F., AKAWIE R.J. et CLARK W.C. (1956) -
Conversion of ^{14}C arterenol to epinephrine in vivo.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.V.), 93, 104
- MATTOK G.L., WILSON D.L. et HEACOCK R.A. (1966) -
Differential estimation of adrenaline, noradrenaline, dopamine, metanephrine and normetanephrine in urine.
Clin. Chim. Acta, 14, 99
- MILLER T. et METCALF R.L. (1968) -
The cockroach heart as a bioassay organ.
Entomologia exp. appl., 11, 455
- MOLINOFF P.B. et AXELROD J. (1969) -
Octopamine : normal occurrence in sympathetic nerves of rats.
Science, 164, 428
- MONTAGU K.A. (1963) -
Some catechol compounds other than noradrenaline and adrenaline in brains.
Biochem. J., 86, 9
- MURDOCK L.L. (1971) -
Catecholamines in arthropods : a review.
Compar. Gener. Pharm., 2, 254
- MYHRBERG H.E. (1967) -
Monoaminergic mechanisms in the nervous system of *Lumbricus terrestris*.
Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 81, 311
- NAGATSU T., KUZUYA H. et HIDAKA H. (1967) -
Inhibition of dopamine β hydroxylase by sulfhydryl compounds and the nature of the natural inhibitors.
Biochem. Biophys. Acta, 139, 319
- NATELSON S., LUGOVOY J.R. et PINCUS J.B. (1949) -
A new fluorimetric method for determination of epinephrine.
Arch. Biochem., 23, 157
- NEUVONEN P.J., VAPAATALO H.I. et WESTERMANN E. (1971a) -
Some metabolic effects of DOPA and dopamine in rats.
Acta Pharmacol., 29, suppl. 4, 40
- NEUVONEN P.J., VAPAATALO H.I. et WESTERMANN E. (1971b) -
On the mechanism of some metabolic actions of dopamine.
N.S. Arch. Pharmacol., 271, 325

- OOSAKI T. et ISHII S. (1965) -
Observations on the ultrastructure of nerve cells in the brain of the planarian
Dugesia gonocephala.
Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 66, 782
- ÖSTLUND E. (1954) -
The distribution of catecholamines in lower animals and their effect on the
heart.
Acta Physiol. Scand., 31, suppl. 112, 1
- PELLERIN J. et D'IORIO A. (1957) -
Metabolism of 3-4 dihydroxyphenylalanine 2 ¹⁴C in bovine adrenal homogenate.
Canad. J. Biochem., 35, 151
- PEYRIN L. (1964) -
Dosage des catécholamines urinaires. Méthode fluorimétrique.
Rev. fr. Et. Clin. Biol., 9, 1096
- PEYRIN L. (1967) -
Etude comparative de l'étape terminale de la biosynthèse de l'adrénaline
chez le Chien et chez la Roussette.
Thèse Doctorat es-Sciences, LYON
- PEYRIN L., PERES G. et CIER J.F. (1972 a) -
Recherches sur la transméthylation enzymatique de la noradrénaline dans les
corps axillaires de la petite Roussette (*Scyliorhinus canicula*). I - Etude
du donneur de méthyle.
C.R. Soc. Biol., sous presse
- PEYRIN L., PERES G. et CIER J.F. (1972b) -
Recherches sur la transméthylation enzymatique de la noradrénaline dans les
corps axillaires de la petite Roussette (*Scyliorhinus canicula*).
II - Propriétés physicochimiques du système de méthylation.
C.R. Soc. Biol., sous presse
- PISANO J.J., OATES J.A., KARMEN A., SJOERDSMA A. et UDENFRIEND S. (1961) -
Identification of synephrine in human urine.
J. Biol. Chem., 236, 898
- POTTER L.T. et AXELROD J. (1963) -
Subcellular localization of catecholamines in tissues of rat.
J. Pharmacol. exp. Therap., 142, 291
- PRICE H.L. et PRICE M.L. (1957) -
The chemical estimation of epinephrine and norepinephrine in human and canine
plasma. II - A critique of the trihydroxyindole method.
J. Lab. Clin. Med., 50, 769
- PUJOL J.F. (1967) -
Monoamines et sommeil.
Thèse Méd., LYON
- ROSENFELD G., LEEPER L.C. et UDENFRIEND S. (1958) -
Biosynthesis of norepinephrine by the isolated perfused calf adrenal.
Arch. Biochem. Biophys., 74, 252
- RUDE S. (1969) -
Catecholamines in the ventral nerve cord of *Lumbricus terrestris*.
Compar. Biochem. Physiol., 28, 747
- RUTLEDGE C.O. et JONASON J. (1967) -
Metabolic pathways of dopamine and norepinephrine in rabbit brain in vitro.
J. Pharmacol. exp. Therap., 157, 493

- SANO I., GAMO T., KAKIMOTO Y., TANIGUCHI K., TAKESADA M. et NISHINUMA K. (1959) -
Distribution of catechol compounds in human brain.
Biochim. Biophys. Acta, 32, 586
- SCHÜMANN H.J. (1956) -
Nachweis von Oxytyramin in sympathischen Nerven und Ganglien.
Arch. exp. Path. Pharmacol., 227, 566
- SCHÜMANN H.J. (1958) -
Über den Noradrenalin- und ATP-Gehalt sympathischer Nerven.
Arch. exp. Path. Pharmacol., 233, 296
- SCHÜMANN H.J. (1959) -
Über den Hydroxytyramin-gehalt der Organe.
Arch. exp. Path. Pharmacol., 236, 474
- SEKERIS C.E. et KARLSON P. (1966) -
Second symposium on catecholamines.
Biosynthesis of catecholamines in Insects.
Pharmacol. Rev., 18, 89
- SHEPHERD D.M. et WEST G.B. (1953) -
Hydroxytyramine and the adrenal medulla.
J. Physiol. (London), 120, 15
- SPECTOR S., SJOERDSMA A., ZALTZMAN-NIRENBERG P., LEVITT M. et UDENFRIEND S. (1963) -
Norepinephrine synthesis from tyrosine ¹⁴C in isolated perfused guinea pig heart.
Science, 139, 1299
- STJÄRNE L. et LISHAJKO F. (1966) -
Drug induced inhibition of noradrenaline synthesis in vitro in bovine splenic nerve tissue.
Brit. J. Pharmacol., 27, 398
- SWEENEY D. (1963) -
Dopamine : its occurrence in mollusc and ganglion.
Science, 139, 1051
- TAKEUCHI O., SATOH S. et HASHIMOTO K. (1971) -
Role of dopamine in the secretory mechanism of the canine pancreas.
Tohoku J. exp. Med., 104, 203
- UDENFRIEND S., ZALTZMAN-NIRENBERG P., GORDON R. et SPECTOR S. (1966) -
Evaluation of the biochemical effects produced in vivo by inhibitors of the three enzymes involved in norepinephrine biosynthesis.
Molec. Pharmacol., 2, 95
- UDENFRIEND S. et CREVELING C.R. (1959) -
Localization of dopamine β oxidase in brain.
J. Neurochem., 4, 350
- VALK A.T., PRICE J.R. et PRICE H.L. (1956) -
Critique of the ethylene diamine condensation method.
J. Clin. Invest., 35, 837
- VANDERMEULEN R., CESSION FOSSON A., LECOMTE J., ORBAN F. et LEJEUNE G. (1969) -
Présence de dopamine dans les surrénales humaines.
Rev. fr. Et. Clin. Biol., 14, 283
- Van Der SCHOOT J.B., CREVELING C.R., NAGATSU T. et UDENFRIEND S. (1963) -
On the mechanism of inhibition of dopamine β oxidase by benzyloxyamines.
J. Pharmacol. Therap., 141, 74

- VANOV S. (1963) -
Effect of pronethalol on some inhibitory actions of catecholamines.
J. Pharm. Pharmacol., 15, 723
- VIVEROS O.H., ARQUEROS L., CONNETT R.J. et KIRSHNER N. (1969a) -
Mechanism of secretion from the adrenal medulla. III - Studies of dopamine β hydroxylase as a marker for catecholamine storage vesicle membranes in rabbit adrenal glands.
Molec. Pharmacol., 5, 60
- VIVEROS O.H., ARQUEROS L. et KIRSHNER N. (1968) -
Release of catecholamines and dopamine β oxidase from the adrenal medulla.
Life Science, 7, 609
- VIVEROS O.H., ARQUEROS L. et KIRSHNER N. (1969b) -
Mechanism of secretion from the adrenal medulla. V - Retention of storage vesicle membranes following release of adrenaline.
Molec. Pharmacol., 5, 342
- VIVEROS O.H., ARQUEROS L. et KIRSHNER N. (1971a) -
Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VI - Effect of reserpine on the dopamine β hydroxylase and catecholamine content and on the buoyant of adrenal storage vesicles.
Molec. Pharmacol., 7, 434
- VIVEROS O.H., ARQUEROS L. et KIRSHNER N. (1971b) -
Mechanism of secretion from the adrenal medulla. VII - Effect of insulin administration on the buoyant density, dopamine β hydroxylase and catecholamine content of adrenal storage vesicles.
Molec. Pharmacol., 7, 444
- WASSERMANN G.F. (1964) -
Estructura y secrecion del tejido adrenalinogeno y noradrenalinogeno de la serpiente *Xenodon meremii*.
Thèse de Doctorat. Université de Buenos-Aires
- WEIL-MALHERBE et BONE A.D. (1957) -
The estimation of catecholamines in urine by a chemical method.
J. Clin. Path., 10, 138
- WEINSHILBOUM R. et AXELROD J. (1971) -
Serum dopamine β hydroxylase activity.
Circul. Res., 28, 307
- WELSH J.H. et KING E.C. (1970) -
Catecholamines in planarians.
Compar. Biochem. Physiol., 36, 683
- WELSH J.H. et WILLIAMS L.D. (1970) -
Monoamine containing neurones in planaria.
J. Compar. Neurol., 138, 103
- WINKLER H. (1971) -
The membrane of the chromaffin granule.
Phil. Trans. Roy. Soc. London, 261, 293 - B - *Biological Sciences*
- WURTMAN R.J., NOBLE E.P. et AXELROD J. (1967) -
Inhibition of enzymatic synthesis of epinephrine by low doses of glucocorticoids.
Endocrinology, 80, 825

- YARON Z. (1970) -
The chromaffin and Interrenal cells of *Acanthobrama Terrae-sanctae* (Cyprinidae,
Teleostei).
Gen. Compar. Endocrin., 14, 542
- YORK D.H. (1970) -
Possible dopaminergic pathway from substantia nigra to putamen.
Brain Res., 20, 233

TABLE DES MATIÈRES

Principaux symboles - Principales abréviations
Introduction.

1ÈRE PARTIE - ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
CHAPITRE I - LES VOIES DE SYNTHÈSE DE L'ADRENALINE.....	3
I - Schéma de Blaschko.....	3
II - Les voies accessoires.....	3
1/ Description.....	3
2/ Réalité de ces transformations.....	5
III - Conclusion.....	8
CHAPITRE II - LA DOPAMINE DANS LE REGNE ANIMAL.....	9
I - La dopamine chez les Mammifères.....	9
1/ Répartition tissulaire.....	9
2/ Localisation cellulaire.....	9
3/ Rôle de la dopamine.....	11
4/ Conclusion.....	12
II - La dopamine chez les autres Vertébrés.....	13
1/ Les Oiseaux.....	13
2/ Les Reptiles.....	13
3/ Les Batraciens.....	13
4/ Les Poissons.....	15
5/ Les Cyclostomes.....	16
III - La dopamine chez les Invertébrés.....	16
1/ Les Echinodermes.....	16
2/ Les Arthropodes.....	16
3/ Les Mollusques.....	18
4/ Les Annelides.....	19
5/ Les Coelentérés.....	19
IV - Conclusion.....	19
CHAPITRE III - LA DOPAMINE β OXYDASE.....	22
I - Caractéristiques physicochimiques.....	22
II - Les étapes de la réaction enzymatique.....	22
III - Spécificité de l'enzyme.....	24
IV - Localisation de l'activité enzymatique.....	26
1/ Les granules.....	26
2/ Préparation d'extraits enzymatiques.....	27
3/ Localisation intragranulaire.....	27
V - Les inhibiteurs.....	28
1/ Les inhibiteurs exogènes.....	28
2/ Les inhibiteurs endogènes.....	29
VI - Activité enzymatique.....	31

VII - Les conditions expérimentales d'incubation.....	31
1/ le pH.....	31
2/ Les cofacteurs.....	31
VIII - Conclusion.....	33
2ÈME PARTIE - MATÉRIEL ET MÉTHODES -.....	35
CHAPITRE I - MATERIEL.....	36
I - Les animaux.....	36
1/ Les Poissons.....	36
2/ Les Rats.....	37
II - Appareils.....	37
III - Réactifs.....	37
CHAPITRE II - L'EXTRACTION ET LE DOSAGE DE LA DOPAMINE TISSULAIRE	39
I - L'extraction de la Dopamine.....	39
1/ Les différentes techniques.....	39
2/ Choix d'une technique.....	40
II - Le dosage de la Dopamine.....	42
1/ Les différentes techniques fluorimétriques.....	42
2/ Choix d'une méthode de dosage.....	43
CHAPITRE III - LES INCUBATIONS ENZYMATIQUES.....	44
I - Les milieux d'incubation.....	44
1/ Les principaux constituants de la réaction.....	44
2/ Le volume final de l'incubation.....	45
3/ Concentration saline dans le milieu d'incubation.....	46
4/ Schéma de préparation des milieux d'incubation.....	46
5/ Durée de l'incubation.....	48
II - Séparation du substrat ^{14}C et du produit ^{14}C néoformé.....	48
1/ EXtraction du contenu de l'incubation enzymatique.....	48
2/ Comptage radioactif des fractions éluées.....	48
III - Identification du produit de la réaction enzymatique néoformée	51
1/ Position du composé ^{14}C dans le diagramme de fractionnement	51
2/ Chromatographie et autoradiographie.....	52
3ÈME PARTIE - RÉSULTATS -	53
CHAPITRE I - MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DE LA DOPAMINE.....	54
I - L'Extraction de la Dopamine.....	54
1/ Mode opératoire général.....	54
2/ Etude de l'extraction de la dopamine en mélange avec la noradrénaline et l'adrénaline contenues dans un milieu pur.....	55
3/ Etude de l'extraction de la dopamine en mélange avec la noradrénaline et l'adrénaline contenues dans un milieu impur.....	61
II - Etude des conditions de dosage de la dopamine.....	65
1/ Mode opératoire général pour l'étude du dosage.....	65
2/ Etude systématique des différents paramètres du dosage fluorimétrique.....	66

III - Etude critique de l'ensemble de la technique mise au point (extraction et dosage).....	71
1/ Spécificité de la technique.....	71
2/ Sensibilité de la technique.....	72
IV - Protocole général d'expérimentation pour la détermination de la dopamine contenue dans le tissu chromaffine de la Roussette.....	76
1/ Extraction.....	76
2/ Dosage fluorimétrique.....	77
CHAPITRE II - ANALYSE QUANTITATIVE DE LA DOPAMINE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE.....	79
I - Analyse quantitative de la dopamine.....	79
1/ CONcentration en dopamine.....	81
2/ Pourcentage en dopamine par rapport à la quantité totale de catécholamines.....	81
II - Identification du composé élué.....	82
1/ Propriétés chromatographiques.....	83
2/ Propriétés spectrofluorimétriques.....	83
III - Conclusion.....	84
CHAPITRE III - L'HYDROXYLATION DE LA DOPAMINE EN NORADRENALINE DANS LE TISSU CHROMAFFINE DE LA ROUSSETTE.....	85
I - Conduite des expériences - Expression des résultats.....	86
1/ Conduite des expériences - Rappels.....	86
2/ Expression des résultats.....	86
II - Le substrat dopamine 2 ¹⁴ C - L'impureté Y	87
III - Etude de la réaction enzymatique dans différents milieux d'incubation.....	90
1/ Effet de la catalase.....	90
2/ Effet de la N éthylmaleimide.....	91
3/ Effet de l'augmentation de la quantité de tissu.....	95
4/ Le pH de la réaction enzymatique.....	97
IV - Identification du produit ¹⁴ C néoformé.....	98
1/ Propriétés chromatographiques sur amberlite CG 50.....	99
2/ Propriétés chromatographiques sur papier.....	99
CHAPITRE IV - DISCUSSION.....	100
I - La dopamine constituant du tissu chromaffine de la Roussette.....	100
1/ Analyse des résultats.....	100
2/ Discussion.....	101
II - L'hydroxylation de la Dopamine en noradrénaline dans le tissu chromaffine de la Roussette.....	102
1/ La source enzymatique - La température.....	102
2/ Les blancs d'incubation.....	102
3/ Validité des résultats.....	103
4/ Présence d'un système enzymatique d'hydroxylation.....	104
5/ Interprétation des effets des différents paramètres étudiés.....	105
6/ Valeur de l'activité enzymatique.....	109
7/ Limite de notre étude.....	110
CONCLUSION.....	111
BIBLIOGRAPHIE.....	114

Vu.

Les membres du jury :

M. Audouin

D. B.

E. Feyrie

Daniel Gauthier

Vu et approuvé.

Le Directeur de l'U.E.R.
de

Le Directeur de l'U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE,

Daniel Gauthier

Vu et accordé le permis d'imprimer.
Lyon, le 20 juin 1972

Le Président de l'Université
Claude Bernard,

160
J. BOIDIN

